

ENTWICKLUNG EINER MIKROENZYMATISCHEN
METHODE ZUR BESTIMMUNG VON PYRIDOXALPHOSPHAT
UND IHRE ANWENDUNG IN BLUT, LIQUOR
CEREBROSPINALIS UND URIN

RUDOLF RASSHOFER

1985

*Less
München*

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. v. Haunerschen Kinderspital

Direktor : Prof. Dr. H.-B. Hadorn

ENTWICKLUNG EINER MIKROENZYMATISCHEN METHODE ZUR BESTIMMUNG
VON PYRIDOXALPHOSPHAT UND IHRE ANWENDUNG IN BLUT, LIQUOR
CEREBROSPINALIS UND URIN.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rudolf Raßhofer
aus München
1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. W. Endres

Mitberichterstatter : Prof. Dr. H.-B. Hadorn

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter : Dr. Y.-S. Shin

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 28.11.1985

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. W. Th. Endres,

für seine jederzeit freundlich gewährte Hilfe und Aufmunterung bei verschiedenen Problemen während jeder Phase der Arbeit

Frau Dr. Y.-S. Shin,

für ihre ständige Betreuung und die wertvollen "Know how"-Hilfen

Herrn Prof. Dr. H.-B. Hadorn,

für die Bereitstellung der Laboreinrichtungen der Universitätskinderklinik München und sein Interesse an der Arbeit.

Außerdem möchte ich danken allen Mitarbeitern der Laboratorien der Haunerschen Kinderklinik, die die Arbeit unterstützten, sowie Frau M. Zeug für die Erstellung des Typoskripts.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1 Nomenklatur der Pyridoxingruppe, chemische Eigenschaften der einzelnen Wirkstoffe, Bedeutung im Stoffwechsel.	1
1.2 Biochemische Funktion	3
1.3 Metabolismus von Vitamin B6	5
1.4 Funktionelle Tests für den Vitamin B6-Status	8
2. ENZYMATISCHER NACHWEIS VON PYRIDOXALPHOSPHAT MIT TYROSIN-DECARBOXYLASE	10
2.1 Erstbeschreibung der Methode	10
2.2 Verschiedene Modifikationen des Testansatzes	12
2.3 Methode nach Reinken	15
2.3.1 Konzentration der Reagenzien im Ansatz	17
2.3.2 Nachteile der Meßmethode	21
2.3.3 Möglichkeiten für eine Weiterentwicklung des Tests und Erwartungen an die modifizierte Methode	22
3. CHEMIKALIEN	23
4. ENTWICKLUNG EINER MODIFIKATION DER NACHWEISMETHODE	24
4.1 Reaktionsgleichung	24
4.2 Säulenchromatographische Trennung von Tyrosin und Tyramin	25
4.2.1 Wahl des Adsorbens	25
4.2.2 Bedingungen der Bindung von Tyrosin an DEAE-Cellulose	28
4.2.3 Bedingungen der Elution von Tyramin	30
4.2.4 Aufbereitung der Cellulose	33
4.2.5 Titration der Cellulose	35
4.2.6 Ablauf des Trennvorganges	37
4.3 Szintillationszählung	37
4.4 Optimierung der Reaktionsbedingungen	39
4.4.1 Verkleinerung des Analysenansatzes	39
4.4.1.1 Ermittlung optimaler Substanzkonzentrationen im Analysenansatz	41

	Seite
4.4.2	Optimaler pH-Wert 47
4.4.3	Einfluß der Puffermolarität 48
4.5	Ausführung des Meßansatzes 49
5.	ZUVERLÄSSIGKEIT DER METHODE 50
5.1	Eigenschaften der Tyrosindecaboxylase 50
5.1.1	Stabilität 50
5.1.2	Aktivität 50
5.1.3	Spezifität 52
5.2	Präzision der Methode 54
5.3	Vergleichswerte in der Literatur für den Plasma-PLP-Gehalt
6.	ANWENDUNG DER MESSMETHODE AUF BLUT- UND URINPROBEN 56
6.1	Deproteinisierung von Plasmaproben 56
6.2	Stabilität von PLP im Probenmaterial 59
6.3	Wiederfindungsversuche 64
6.4	Messungen des PLP-Gehalts im Vollblut und Urin bei 5 Altersgruppen 69
6.4.1	Material 69
6.4.2	Ergebnisse 69
6.4.3	Erläuterungen 72
7.	MESSUNG VON PYRIDOXALPHOSPHAT IM LIQUOR CEREBRO-SPINALIS 74
7.1	Einleitung: Bedeutung von Vitamin B6 für das Zentralnervensystem 74
7.1.1	Vitamin B6-Mangel 74
7.1.2	Vitamin B6-abhängige Krampfanfälle 78
7.1.2.1	Fallbeschreibungen 78
7.1.2.2	Stoffwechseluntersuchungen 82
7.1.2.3	Erweitertes klinisches Spektrum der Vitamin B6-abhängigen Krämpfe 84
7.1.2.4	Biochemische Untersuchungen 87
7.1.3	Beziehungen zwischen Vitamin B6 und GABA im Zentralnervensystem 91
7.1.3.1	Überblick über den GABA-Stoffwechsel 91
7.1.3.2	Synthese und Abbau von GABA 94
7.1.3.3	GABA-Transportsysteme und Vitamin B6 99
7.1.3.4	GABA- Rezeptorinteraktionen und Vitamin B6 101

	Seite
7.1.3.5 Modelle für eine epileptogene Wirkung von PLP	104
7.2 Aufgabenstellung	109
7.2.1 Definition von Normalwerten	110
7.3 Material	110
7.3.1 Stabilität von PLP in Liquorproben	110
7.4 Methoden	113
7.5 Ergebnisse	114
7.5.1 Häufigkeitsverteilung der Meßdaten im Liquor cerebrospinalis	114
7.5.2 Korrelation von Liquor- und Plasma-PLP-Gehalt	117
7.5.3 Altersabhängigkeit der Liquor- und Plasmakonzentration von Pyridoxalphosphat	123
7.5.4 Vergleich der Mittelwerte von Liquor-PLP-Konzentration, Plasma-PLP-Konzentration und Liquorproteingehalt dreier Altersgruppen	129
7.5.5 Korrelation von Liquorproteingehalt und Liquor-PLP-Konzentration	131
7.5.6 PLP-Spiegel im Liquor Cerebrospinalis bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen des ZNS	134
7.6 Diskussion	143
7.6.1 Vergleichswerte für Liquor-PLP-Messungen	143
7.6.2 Bedeutung des Liquor-PLP-Gehalts als Indikator : Transport und Metabolismus von Vitamin B6 im Gehirn	145
7.6.3 Interpretation der Meßergebnisse im Hinblick auf die PLP-Homöostase des ZNS	148
7.6.4 Liquor-PLP-Gehalt im frühen Lebensalter	151
7.6.5 Erläuterungen zu den Liquor-PLP-Befunden bei Patienten mit verschiedenen neurologischen Symptomen	156
7.6.5.1 Meningitis	156
7.6.5.2 Hydrocephalus	162
7.6.5.3 Patienten mit Krampfsymptomatik	163
8 ZUSAMMENFASSUNG	178
9 LITERATURVERZEICHNIS	179

1. EINLEITUNG

1.1 Nomenklatur der Pyridoxingruppe, chemische Eigenschaften der einzelnen Wirkstoffe, Bedeutung im Stoffwechsel.

Unter dem Begriff Vitamin B 6 läßt sich eine Gruppe von drei verschiedenen Verbindungen und deren phosphorylierten Derivaten zusammenfassen, deren Grundstruktur der Pyridin-Ring ist. Man unterscheidet, je nach dem Rest an der 4'-Stellung des Sechsrings, eine Alkoholform (Pyridoxin, PN), eine Aldehydform (Pyridoxal, PL) und das Pyridoxamin (PM). (Siehe auch Abbildung 1).

Vitamin B 6 gehört wie Ascorbinsäure, Pantothersäure, Folsäure und die anderen B-Vitamine zur Gruppe der wasserlöslichen Vitamine. Wie alle diese Verbindungen ist es essentieller Partner enzymatischer Reaktionen, also Coenzym. Die aktive Form, Pyridoxalphosphat (PLP), hat kokatalytische Funktion hauptsächlich bei Enzymen, die Veränderungen am α -, β -, oder γ -C-Atom der Aminosäuren durchführen, wie z. B. Transaminierungen, Decarboxylierungen, Racemisierung am α -C-Atom und Abspaltung oder Austausch von Seitengruppen der β - und γ -C-Atome. Außerdem benötigt z.B. die Glykogenphosphorylase PLP als Coenzym. Wegen des hohen Gehalts dieses Enzyms im Skelettmuskel stellt die Muskulatur den wichtigsten PLP-Speicher des Organismus dar (99, 101, 136).

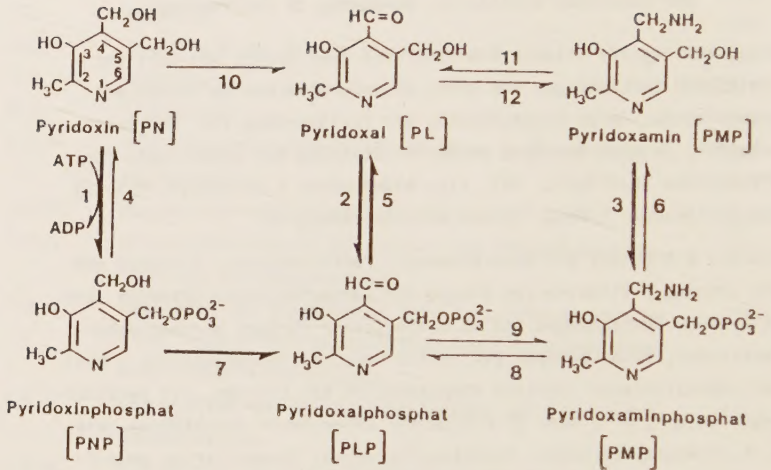


Abb. 1 : Metabolismus und Nomenklatur der Vitamin B-6-Metaboliten

Die Reaktionen 1 / 2 / 3 werden durch Pyridoxalkinase unter Verbrauch von ATP, mit Zn^{2+} -Ionen als prosthetischer Gruppe katalysiert. Das bevorzugte Substrat dieses Enzyms ist Pyridoxal.

Reaktionen 4 / 5 / 6 : Unspezifische Phosphatasen

Reaktionen 7 / 8 werden durch Pyridoxinphosphatoxidase katalysiert. Pyridoxin wird durch Pyridoxinoxidase in Pyridoxal umgewandelt (Reaktion 10); Coenzym ist FAD;

Die Umwandlungen 9 / 11 / 12 sind mit verschiedenen Transaminierungsreaktionen verknüpft.

Die fett gezeichneten Pfeile bezeichnen die wichtigsten Reaktionswege in der Leber.

Die Nomenklatur entspricht der von der IUPAC (Kommission für Biologische Nomenklatur) vorgeschlagenen.

Literatur: (27, 51, 52, 136, 163).

1.2 Biochemische Funktion

An dieser Stelle soll die von PLP kokatalysierte Decarboxylierung von Aminosäuren näher beschrieben werden, da die verbreitetste, auch in dieser Arbeit verwendete enzymatische Nachweismethode für PLP auf dieser Reaktion basiert.

Zunächst ist auf die Bedeutung der Phosphatgruppe für die Wirksamkeit des Pyridoxals hinzuweisen. Das Vorliegen einer freien Aldehydgruppe ist essentiell für die coenzymatische Funktion. Pyridoxal existiert nun allerdings überwiegend nicht in der oben gezeigten Form mit freier Aldehydgruppe (Abb. 2), sondern mit intramolekularer zyklischer Hemiacetalgruppe, bei deren Vorliegen die Aldehydgruppe keine Bindungen eingehen kann. Die im Pyridoxalphosphat eingeführte Phosphatgruppe wird mit der Hydroxymethylgruppe in 5-Stellung verestert, wodurch die Aldehydfunktion in 4-Stellung frei wird (Abb. 2) (101).

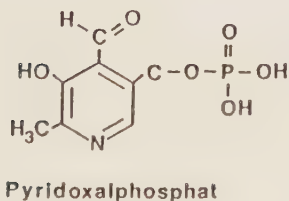
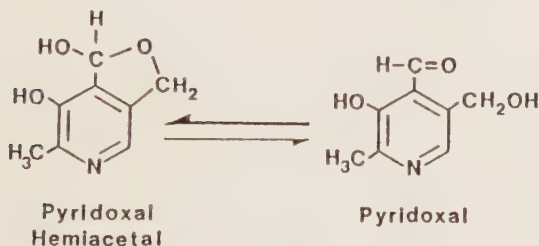


Abb. 2 : Chemische Struktur von Pyridoxal und Pyridoxalphosphat (101)

Grundlegend für die Katalyse durch PLP ist die Bildung einer Schiffschschen Base (Aldimin) zwischen der Aldehydfunktion des Co-enzym und der Aminogruppe am α -C-Atom einer Aminosäure (Abb.3.1.). Innerhalb des so entstandenen Coenzym-Substratkomplexes wirken drei Gruppen elektronenanziehend:

1. Der Pyridinring mit dem in saurer Lösung protonierten Stickstoffatom in 1-Stellung
2. Das Stickstoffatom der α -Aminogruppe
3. Das Metallion am Apoenzym (E^+), das dem Stickstoffatom der α -Aminogruppe, dem Sauerstoffatom der phenolischen Hydroxylgruppe und dem Sauerstoffatom der α -Carboxylgruppe zugeordnet ist (Abb. 3.2.) (101).

Diese drei Gruppen entziehen den Bindungen der Aminosäure Elektronen und labilisieren diese dadurch (Pfeile der Abb. 3.2). Nach abgelaufener Abspaltung einer Seitengruppe der Aminosäure wird die Schiffschsche Base wieder hydrolysiert und es liegen dann das gebildete Amin und CO_2 vor (Abb. 3.3) (74).

Von der Struktur des Apoenzyms hängt es ab, welche Bindung innerhalb der Aminosäure gelöst wird (74).

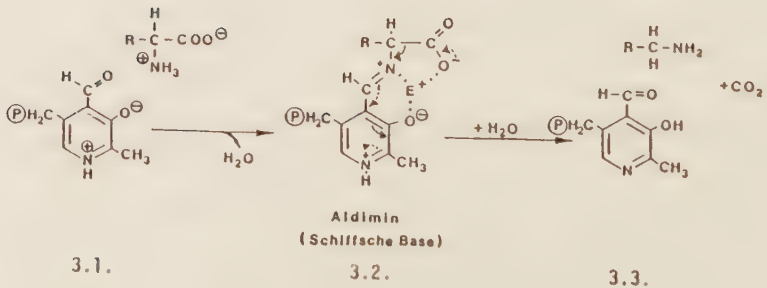


Abb. 3 : PLP-katalysierte Decarboxylierungsreaktion (nach 74 , 101)

1.3 Metabolismus von Vitamin B 6

Metabolismus in der Leber

Die drei nicht phosphorylierten durch die Nahrung aufgenommenen Metaboliten von Vitamin B 6 werden in der Leber durch eine ATP- und Zink-abhängige Phosphotransferase (Pyridoxalkinase) phosphoryliert. Hauptweg der Synthese von PLP in der Leber ist Pyridoxin $\longrightarrow$ Pyridoxinphosphat $\longrightarrow$ Pyridoxalphosphat (siehe Abb. 1). Pyridoxinphosphat (PNP) ist dabei nur Zwischenprodukt, es akkumuliert in der Zelle nicht (167). Der Abbau der phosphorylierten Derivate erfolgt durch Dephosphorylierung und Umwandlung in Pyridoxal. Pyridoxal wird durch die Aldehydoxidase zu Pyridoxsäure katabolisiert, die nierengängig ist. Pyridoxaminphosphat wird zuerst zu PLP umgewandelt, dann wie dieses abgebaut. Nach oraler Gabe von Pyridoxin steigen in der Leber hauptsächlich die Konzentrationen von Pyridoxal, Pyridoxalphosphat und von Pyridoxsäure an. Die Akkumulation von Pyridoxaminphosphat geschieht etwas langsamer, es bildet aber zusammen mit PLP die hauptsächlichliche Speicherform in der Leber (92).

In Tierversuchen wurde gezeigt, daß die Leber die Hauptquelle von PLP im Plasma ist (97). Leberzellen besitzen, im Gegensatz zu anderen Zellen, einen Transportmechanismus für den Auswärtstransport von PLP. Es wird vermutet, daß auch an Albumin gebundenes PLP freigesetzt werden kann (97). Im Gegensatz dazu kann Pyridoxaminphosphat nicht auswärts transportiert werden, sondern muß vorher zu PLP umgewandelt werden. Es wurden in der Leber zwei verschiedene Reservoirs von PLP postuliert, die sich durch ihre Umsatzraten unterscheiden. Neu synthetisiertes PLP befindet sich in dem Kompartiment mit schnellem Umsatz. Der Austausch zwischen diesen beiden Kompartimenten ist nur gering (92). PLP ist in der Leberzelle zu 80 % an verschiedene Proteine gebunden (22). Die Proteinbindung ist ein wesentlicher Faktor in der Regulation der PLP-Konzentration sowohl in der Leber als auch im Plasma und den Erythrozyten, da proteingebundenes PLP langsamer durch Phosphatase hydrolysiert wird als freies PLP (99). Im Plasma ist PLP überwiegend an Albumin gebunden.

Metabolismus in Erythrozyten

In den Erythrozyten wird Pyridoxin durch Pyridoxalkinase zu Pyridoxinphosphat phosphoryliert, dann zu Pyridoxalphosphat oxidiert (PNP-Oxidase). Der Auswärtstransport erfolgt durch Dephosphorylierung zu Pyridoxal, das in das Plasma austreten kann (3).

Wie für andere Zellen konnte auch für Erythrozyten nachgewiesen werden, daß nicht phosphorylierte B 6-Metaboliten schnell intrazellulär aufgenommen werden, im Gegensatz zu phosphorylierten Derivaten. Für Pyridoxin und Pyridoxal wird passive Diffusion als Transportmodus vermutet (107). Intrazellulär werden dann die aufgenommenen Formen phosphoryliert, wobei die Produkte PLP und PMP zugleich als Speicher- und aktive Formen dienen. Die Akkumulation von Metaboliten ist einerseits durch Phosphorylierung möglich, da die phosphorylierten Metaboliten nicht transmembranär transportiert werden, oder durch Bindung an Proteine. Die Speicherung von Pyridoxal in Erythrozyten kommt durch dessen Bindung an Hämoglobin zustande. PLP ist in den Erythrozyten ebenfalls an Hämoglobin und an Apoenzyme wie z.B. GOT gebunden (14,107,148).

Die Synthese von PLP aus Pyridoxin geschieht also wie in der Leber, nur tragen die Erythrozyten nicht zur Erhöhung des Plasma-PLP-Spiegels bei, da sie es nicht auswärts transportieren können (3).

Für die Verteilung von Pyridoxal zwischen Erythrozyten und Plasma sind die Proteinbindungsverhältnisse im Plasma entscheidend. Werden Erythrozyten in physiologischer Kochsalzlösung inkubiert, die Pyridoxal, aber kein Albumin enthält, akkumulieren die Erythrocyten Pyridoxal bis zu 14 $\mu\text{mol/ml}$. Gibt man anschließend die Erythrozyten in ein Medium, das Albumin, aber kein Pyridoxal enthält, geben sie 75 % des aufgenommenen Pyridoxals wieder ab (147). Das heißt, es besteht ein Äquilibrium zwischen dem Pyridoxalgehalt in Erythrozyten und Plasma, das von der jeweiligen Proteinbindung in den beiden Kompartimenten abhängt. Es wird vermutet, daß die Erythrozyten zum Ausgleich von raschen Verlusten des Transportmetaboliten Pyridoxal aus dem Plasma beitragen könnten (3, 147).

Metabolismus im Gehirn

Auch im Gehirn finden die durch Pyridoxalkinase und Pyridoxinphosphat-oxidase katalysierten Reaktionen des Vitamin B 6 Metabolismus statt. Tierversuche mit oraler Gabe von radioaktiv markiertem Pyridoxin zeigten, daß eine Stunde nach Einnahme schon das gesamte radioaktive Pyridoxin im Gehirn metabolisiert war (38). Es fanden sich Pyridoxinphosphat und Pyridoxal sowie Pyridoxalphosphat, das nach diesem Zeitraum den maximalen Spiegel im Gehirn erreichte. Man schloß daraus, daß Pyridoxin sowohl über das Zwischenprodukt Pyridoxinphosphat als auch durch primäre Oxidation zu Pyridoxal in PLP umgewandelt wird. Pyridoxaminphosphat kann im Gehirn nur über PLP als Zwischenprodukt synthetisiert werden. Wie in der Leber sind die vorherrschenden Metaboliten auch im Gehirn PLP und PMP (93).

Zur Blut-Hirnschranke für Vitamin B 6 siehe Kapitel 7.6.2. .

Es seien hier kurz einige Aspekte des Vitamin B 6-Metabolismus zusammengefaßt:

Nicht phosphorylierte Metaboliten sind die Transportformen, da sie membrangängig sind.

PLP ist wegen seiner hohen Proteinbindung in allen Geweben Speicherform, zugleich auch biochemisch aktive Form von Vitamin B 6.

Der Austausch von Vitamin B 6 zwischen zwei Kompartimenten erfolgt nach folgendem Schema:

1. PLP wird in einem Kompartiment dephosphoryliert.
2. Das entstandene Pyridoxal kann transmembranär transportiert werden.
3. Im zweiten Kompartiment wird Pyridoxal wieder rephosphoryliert, um es intrazellulär festzuhalten.
4. Das resynthetisierte PLP wird wieder an Proteine gebunden, um es vor Hydrolyse zu schützen.

1.4 Funktionelle Tests für den Vitamin B 6-Status

Von funktionellen Tests erhofft man sich Rückschlüsse auf den Versorgungszustand des Gesamtorganismus mit Vitamin B 6. Die vorhandenen Tests lassen sich grob unterteilen in enzymatische und metabolische. Da bei vielen klinischen Fallbeschreibungen solche Tests verwendet wurden, seien die beiden häufigsten kurz erwähnt.

a.) Enzymatischer Test: Transaminasenaktivität im Blut.

Dieser Test beruht auf der Tatsache, daß die Transaminasen PLP als Coenzym benötigen. Man verwendet zwei Kriterien zur Beurteilung der Vitamin B 6-Versorgung: Die basale Enzymaktivität, die bei Vitamin B 6 - Mangel erniedrigt ist, und die in-vitro-Stimulierbarkeit der Enzyme, die bei B 6-Mangel entsprechend erhöht ist. Betrachtet werden überwiegend die erythrozytäre GOT und GPT. Als direktes Maß für die Sättigung dieser Enzyme mit PLP wird der Aktivations-Koeffizient (AK) verwendet:

$$AK = \frac{\text{Enzymaktivität mit in vitro-Gabe von PLP}}{\text{Enzymaktivität ohne zusätzliches PLP}}$$

Bei GOT z.B. zeigt ein Koeffizient kleiner als 1,5 eine adäquate Vitamin B 6-Versorgung an (7).

b.) Metabolischer Test: Tryptophanbelastungstest.

Im normalen Abbauweg von Tryptophan ist PLP als Coenzym an einer Reaktion beteiligt, die Hydroxykynurenin durch Abspaltung von Alanin in Hydroxyanthranilsäure überführt (Kynureninasereaktion). (Siehe Abb.4). Bei Vitamin B 6-Mangel stauen sich das Substrat dieser Reaktion, Hydroxykynurenin und dessen Vorgänger, Kynurenin, auf und werden über sonst nicht beschrittene Nebenwege, deren Enzyme ebenfalls PLP-abhängig sind, zu Xanthurensäure bzw. Kynurensäure abgebaut. Daß diese Stoffwechselwege, obwohl sie auch PLP-abhängig sind, trotz PLP-Mangels noch funktionieren, führt man darauf zurück, daß deren Enzyme (Aminotransferasen) sowohl im Cytosol als auch mitochondrial vorkommen, die Kynureninase aber nur im Cytosol. Man nimmt daher an, daß Enzyme im Cytosol schneller von Vitamin B 6-Mangel betroffen sind (74).

Als Indikator für verminderte Verfügbarkeit von Vitamin B 6 im Organismus wird die gegenüber Normalpersonen vermehrte Ausscheidung von Xanthurensäure und Kynurensäure verwendet, die insbesondere nach oraler Belastung mit Tryptophan im 24-Stunden-Urin deutlich wird. Manche Autoren verwenden auch den Quotienten

$$\frac{\text{Hydroxyanthranilsäure}}{\text{Xanthurensäure}}$$

im Urin als Maßzahl, die um so kleiner wird, je ausgeprägter der Vitaminmangel ist.

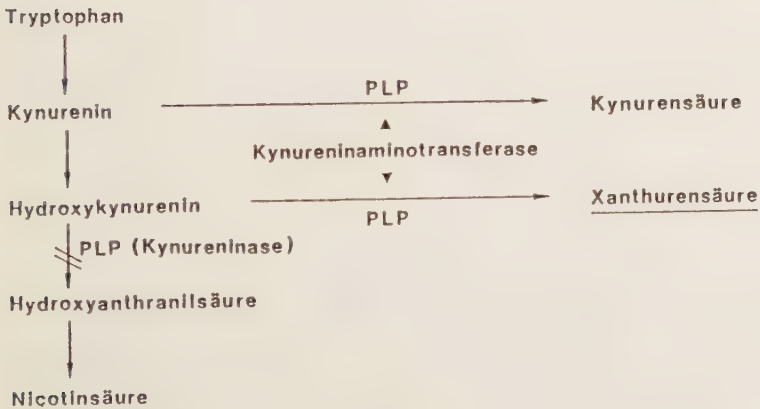


Abb. 4 : Abbauege von Tryptophan (7)

2. ENZYMATISCHER NACHWEIS VON PYRIDOXALPHOSPHAT MIT TYROSIN-DECARBOXYLASE

2.1 Erstbeschreibung der Methode

Die Feststellung von E.E. Snell, daß einige der meistbenutzten Routine-nachweismethoden für Vitamin B 6-Metaboliten direkt aus Methoden hervorgingen, die in den dreißiger und frühen vierziger Jahren zur Entdeckung und Charakterisierung dieser Coenzymfamilie benutzt wurden, trifft auch auf die enzymatischen Analysemethoden zu. Eine heute in der Literatur häufig angeführte Methode, die Tyrosindecarboxylase zum Nachweis von Pyridoxal-phosphat verwendet, wurde erstmals von Umbreit et al. 1944, also fünf Jahre nach der Reindarstellung von Pyridoxin durch Lepkovsky, beschrieben (165). Sie diente dem Nachweis, daß ein von anderen Autoren postuliertes Coenzym, das z. B. für Tyrosindecarboxylase als essentiell angesehen wurde, ein Derivat des damals schon bekannten Pyridoxal sei (66).

Ausgangspunkt hierfür waren Studien von Gale und Epps (61) über bakterielle Aminosäuredecarboxylasen. Solche Enzyme werden von Bakterien produziert, wenn sie in saurem Milieu leben müssen, da durch die Decarboxylierung von Aminosäuren ein neutralisierender Effekt und damit Schutz vor der Säurewirkung eintritt. Diese Enzyme sind für bestimmte Bakterien-Spezies spezifisch, Streptococcus faecalis z.B. produziert nur L- Tyrosindecarboxylase. Gale und Epps hatten festgestellt, daß Lösungen von Decarboxylasen, die durch Ammoniumsulfatfällungen gereinigt worden waren, gegenüber ihren Substraten nur noch sehr geringe Aktivität entwickelten, jedoch wieder volle Aktivität gewannen, wenn gekochte Hefesuspension zugegeben wurde oder gekochte Suspensionen von Bakterien. Es wurde hieraus gefolgert, daß die Aminosäuren-Decarboxylasen aufteilbar waren in ein spezifisches Apoprotein und ein Coenzym. Zugabe von Pyridoxin oder anderer damals bekannter Substanzen mit Coenzymfunktion zu Enzymproteinsuspensionen erhöhten die Aktivität von Decarboxylasen nicht, aber die Zugabe von in Wasser homogenisierten Gewebeproben.

Hiermit konnte gezeigt werden, daß das Coenzym in praktisch allen Säuger-geweben vorhanden war, ebenso in allen Bakterien, in pflanzlichen Geweben, im Blut und auch in gekochten Suspensionen von Lysin- oder Tyrosindecarboxylase, was darauf hinwies, daß das Coenzym für verschiedene Decarboxylasen identisch war und außerdem kein Protein sein konnte, da es relativ hitzestabil war.

Reinigung und Analyse der Codecarboxylase aus getrockneten Hefezellen zeigte, daß sie Kohlenstoff, Stickstoff und Wasserstoff enthielt, aber kein Phosphat (!). Gale und Epps gaben auch keinen Hinweis darauf, daß ein Pyridoxinderivat als Coenzym in Frage käme.

Diesen Schritt vollzogen Umbreit et al., die ein Pyridoxinderivat als Codecarboxylase favorisierten, da sie gefunden hatten, daß Milchsäurebakterien für ihre Decarboxylaseproduktion mehr Pyridoxin benötigten als für maximales Wachstum (65). Analog dazu fanden sie in Streptococcus faecalis-Zellen, die auf pyridoxinfreiem Medium gewachsen waren, keine Decarboxylaseaktivität (66).

Sie verwendeten nun solche Zellen, die vakuumgetrocknet worden waren, für folgende Versuche:

Suspensionen dieser Bakterienzellen wurden inkubiert zusammen mit:

- a.) Pyridoxin
- b.) Pyridoxamin
- c.) aus Hefezellen extrahierter "Codecarboxylase" ("natural coenzyme")
- d.) Pyridoxal, das mit POCl_3 behandelt worden war ("synthetic coenzyme")
- e.) Pyridoxal
- f.) Pyridoxal + ATP.

Es konnte gezeigt werden, daß die Tyrosindecarboxylaseaktivität dieser Bakterienzellen am besten mit dem Hefeextrakt, dem mit POCl_3 behandelten Pyridoxal sowie durch Pyridoxal + ATP stimuliert werden konnte. Im Detail legten die Autoren noch Befunde vor, die die Identität des "natural coenzyme" mit dem Pyridoxalpräparat("synthetic coenzyme") erhärteten: Säurehydrolysiertes "natural coenzyme" konnte durch Zugabe von ATP wieder aktiviert werden, dies war ebenso der Fall bei "synthetic coenzyme", das hydrolysiert worden war.

Damit war sowohl die Struktur des Decarboxylase-Coenzym als Pyridoxalderivat identifiziert als auch der jetzt gebräuchlichste Enzymassay für dieses Derivat, Pyridoxalphosphat, in seiner Urform beschrieben.

Die enzymatischen Methoden zur Bestimmung von PLP basieren alle auf der oben beschriebenen Reaktivierung von gereinigtem Apoenzym durch das Coenzym PLP, sind daher spezifisch für diesen Vitamin B 6-Metaboliten. Im Prinzip eignet sich also jedes PLP-abhängige Enzym zu dessen Nachweis.

Die Reaktionsgleichung für die Tyrosindecaboxylase-Methode lautet:

1. Tyrosin-Apodecarboxylase (TDC) + Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP)

—————→ Tyrosindecaboxylase-Holoenzym

2. L-Tyrosin $\xrightarrow{\text{Apo E} + \text{PLP}}$ L-Tyramin + CO₂

Befinden sich Apoenzym und Substrat im Überschuß im Reaktionsmedium, hängt die Reaktionsgeschwindigkeit nur von der PLP-Konzentration ab und wird sich in einem bestimmten Konzentrationsbereich von PLP linear mit Veränderungen von dessen Konzentration bewegen. Als Maß für die Enzymaktivität bestimmt man eines der Produkte, Tyramin oder CO₂, oder die Konzentrationsabnahme des Substrats Tyrosin.

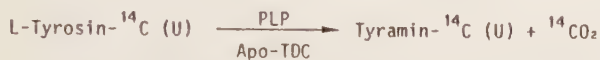
Sowohl Gale und Epps als auch Umbreit et al. benutzten in ihren Studien die manometrische Bestimmung des freigesetzten CO₂ in Warburg-Reaktionsgefäßen.

2.2 Verschiedene Modifikationen des Testansatzes

Die manometrische Bestimmung von produziertem CO₂ fand weiterhin Anwendung, die technischen Probleme waren jedoch bei dieser Methode erheblich. Boxer et al., die 1957 die gleiche Methode zu PLP-Messungen im Blut und Leukozyten nutzten, spezifizierten die Rahmenbedingungen für den Reaktionsablauf unter anderem dahingehend, daß eine Kontrolle der Wasserbadtemperatur auf $\pm 0,005$ °C notwendig sei. Ein weiterer Nachteil der manometrischen Methode lag in der für PLP-Messungen in menschlichem Blut zu geringen Sensitivität. Boxer et al. gaben an, die Empfindlichkeit des Tests gegenüber dem von Umbreit et al. ca. 4- bis 5-fach vergrößert zu haben. Die Nachweisgrenze lag aber bei ca. 10 ng/ml Blut oder Plasmagehalt, das heißt die Mehrzahl der bei Erwachsenen gemessenen Konzentrationen lag unterhalb der Nachweisgrenze. Diese Autoren waren deswegen gezwungen, die Gesamtheit der gemessenen Blutwerte aufzuteilen in solche, die unter 10 ng/ml lagen und diejenigen, die größer waren. Von 113 Probanden einer Gruppe von 17 - 62 Jahren Alter hatten 102 Werte unter 10 ng/ml (25).

Auch durch weitere Veränderungen dieser Methode konnte deren Empfindlichkeit nicht soweit gesteigert werden, um sie für den klinischen Betrieb nutzbar zu machen (72).

Einen entscheidenden Schritt in Richtung größerer Sensitivität der Meßmethode vollzogen Hamfelt et al. 1962 (72). Sie verbanden die Vorteile der enzymatischen Technik (hohe Spezifität) mit denjenigen der Radioisotopenmethoden (hohe Sensitivität), indem sie radioaktiv markiertes Tyrosin (L-Tyrosin- ^{14}C) als Substrat verwendeten. In diesem Tyrosin lagen alle Kohlenstoffatome als ^{14}C -Isotop vor (uniforme Markierung). Die Reaktionsgleichung lautete also:

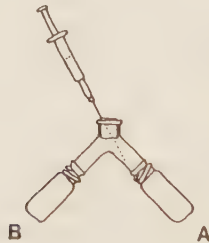


Hamfelt et al. bestimmten die Radioaktivität des Produkts Tyramin als Maß für die Decarboxylierungsrate. Hierzu wurden das im Reaktionsmedium vorliegende Tyrosin und Tyramin nach Ablauf der Reaktion papierchromatografisch getrennt. Die Radioaktivität des Tyramin-Flecks wurde mit Hilfe eines automatischen Scanners bestimmt. 150 μl deproteinisiertes Plasma waren pro Ansatz notwendig. Das Gesamtvolumen des Reaktionsmediums betrug 900 μl . Die Autoren gaben die Nachweisgrenze nicht explizit an, nach der veröffentlichten Standardkurve läßt sie sich auf etwa 1 ng/ml schätzen. Diese Methode bot neben ihrer größeren Sensitivität den Vorteil, daß die aufwendige manometrische Meßtechnik aus dem Ansatz eliminiert werden konnte, ihr Nachteil war jedoch die unbequeme Separationsmethode von Substrat und Produkt.

Maruyama, Bhagavan und Coursin beschrieben 1968 eine Modifikation der Methode, bei der als Substrat Tyrosin verwendet wurde, das nur an der α -Carboxylgruppe mit ^{14}C markiert war (L-Tyrosin-1- ^{14}C). Meßprinzip war hier, das bei der Decarboxylierungsreaktion freigesetzte $^{14}\text{CO}_2$ nach Beendigung der Reaktion mit Stickstoff auszutreiben und die Radioaktivität des nicht umgesetzten Tyrosins mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillation zu messen. Das Prinzip der Bestimmung der Konzentrationsabnahme des Substrats impliziert jedoch, daß die Startkonzentration des Substrats für alle Ansätze möglichst gleich gehalten wird. Im Routinebetrieb wird als mögliche Fehlerquelle die Messung der Konzentrationszunahme des Produkts unkritischer sein, da das Substrat im Überschuß zugegeben wird (103).

Sundaresan und Coursin konzipierten einen solchen Ansatz, bei dem wiederum L-Tyrosin 1- ^{14}C als Substrat zur Anwendung kam, jedoch freigesetztes $^{14}\text{CO}_2$ gemessen wurde (159).

Bei allen Methoden, denen die Radioaktivitätsmessung eines isotonenmarkierten Gases zugrunde liegt, ist es notwendig, dieses Gas vollständig aus dem Reaktionsmedium auszutreiben, um es vom Substrat zu trennen und es dann mit bestimmten Substanzen wieder vollständig zu binden. In der Praxis werden hierzu Reaktionsgefäße benutzt, die aus zwei Kammern bestehen. In der einen befindet sich das Reaktionsmedium, in der anderen das Absorbens für CO_2 , etwa Ammoniumbasen wie z.B. Hyamin-Hydroxid. Die Gefäße müssen natürlich luftdicht verschlossen sein, um ein Entweichen des freigesetzten CO_2 zu verhindern, andererseits muß das Reaktionsmedium noch zugänglich sein, um die Reaktion z.B. durch Zugabe von Substrat starten und durch Säureapplikation stoppen zu können. Dies wird erreicht, indem die Gefäße durch Gummistopfen verschlossen werden und Reagenzien mit Hilfe von Hamilton-spritzen appliziert werden. Es gibt zahlreiche interessante Konstruktionen zur Lösung dieses Problems. Hier ein Beispiel:



Das Kupplungsstück verbindet zwei Szintillationsgefäße. A enthält das Reaktionsmedium, B das Absorbens für CO_2 . Durch den Verschlußstopfen kann injiziert werden. Nach Beendigung der Reaktion muß nur noch Szintillator zum CO_2 -Lösungsmittel gegeben werden.

(Abbildung aus: B.W. Fox: Techniques of sample preparation for liquid scintillation counting. In: T.S. Work, E. Work: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Amsterdam 1970.)

Sundaesan und Coursin verwendeten ein anderes System, bei dem am Verschlußstopfen des Reaktionsgefäßes an einem Plastikstäbchen ein Polyäthylengefäß angebracht ist, das mit Hyamin gefüllt und nach Beendigung der Reaktion abgeschnitten und in Szintillator gebracht wird.

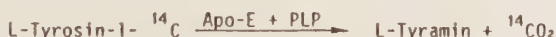


(Schematisch nach der Beschreibung in 159, Hersteller Kontes Glass Co.)

Die Nachweisgrenze dieser Methode lag ähnlich wie diejenige der Methode von Hamfelt et al., bei etwa 1 ng/ml (159). Die Forschergruppe um Coursin beschrieb in weiteren Arbeiten Veränderungen der Methode, wie z.B. Vereinfachungen in der Aufbereitung der Tyrosin-decarboxylase und im Reaktionsablauf. Hierauf wird an anderer Stelle noch eingegangen (20,21).

2.3 Methode nach Reinken

Die oben beschriebenen notwendigen apparativen Ausstattungen wurden von Reinken um eine Variante bereichert, bei der alle Teile wiederverwendbar sind (119). Dieser Versuchsablauf wurde in unserem Labor ursprünglich zur Bestimmung von PLP verwendet und diente als Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen der Methode. Er soll deswegen detaillierter behandelt werden. Die Reaktionsgleichung lautet, wie bei der Methode von Sundaesan und Coursin:



Die Reaktion findet in einem 25 ml-Erlenmeyerkolben statt, in den ein 5 ml-Bechergläschen zur Aufnahme des Hyamins gestellt wird. (Abb. 5).

Alle Arbeitsgänge finden in abgedunkelten Räumen statt, um die Photodekomposition von PLP zu minimieren.

100 µl deproteinisiertes Serum oder Plasma wird auf den Boden des Erlenmeyerkolbens pipettiert, zusammen mit 300 µl einer Tyrosin-decarboxylasesuspension (10 mg Enzym/ml). Es wird mit 0,1 M Natriumacetatpuffer auf 1500 µl Volumen gebracht.



Abb. 5 : Reaktionsgefäß für die Radioenzymatische PLP-Bestimmung nach Reinken (119).

Die Mischung wird dann 30 Minuten lang bei 25 °C unter leichtem Schütteln inkubiert, um die Bindung von Apoenzym und PLP zu ermöglichen und hiernach wieder ins Eisbad gestellt. Dann werden 250 µl der Tyrosinlösung dazupipettiert, die Erlenmeyerkolben mit Gummistopfen dicht verschlossen und 15 Minuten lang bei 32 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Injektion von 1 ml 5 N HCl in das Reaktionsmedium gestoppt. Es folgt die Injektion von 200 µl Hyamin in das Becherglas und eine weitere Inkubationszeit von 30 Minuten bei 32 °C, damit eine vollständige Bindung von CO₂ an das Hyamin stattfinden kann. Das Absorbens wird dann in ein Szintillationsgefäß umpipettiert und 18 ml Turners Szintillator zugegeben (300 ml Methanol, 700 ml Toluol, 3 g PPO, 100 mg POPOP). Die Zählung erfolgt im Szintillations-Spektrometer bei 5 Minuten Zähldauer. In einem bestimmten Bereich der Konzentration von PLP im Reaktionsmedium ist die CO₂-Produktion proportional zu ihr. Die unbekannte PLP-Konzentration einer Probe läßt sich an einer Eichgeraden ablesen, die die Zählrate zur PLP-Konzentration in Beziehung setzt.

2.3.1 Konzentration der Reagenzien im Ansatz

Bei der Anwendung dieser Analysemethode wurden einige Veränderungen der Konzentrationen der Reaktionspartner gegenüber der Originalarbeit notwendig.

Zunächst wurde festgestellt, daß der genuine PLP-Gehalt der Enzympräparation bei einer eingesetzten Enzymmenge von 3 mg pro Ansatz zu hohen Leerwerten und einer schlechten Diskrimination der Meßwerte gegenüber dem Leerwert führte.

Aus Abbildung 6 ist ersichtlich, daß bei steigender Enzymaktivität im Ansatzmedium sich die Zählrate bei einer konstanten zugegebenen PLP-Menge gegenüber dem Leerwert ohne PLP-Zugabe nicht proportional vergrößerte, insbesondere im Bereich sehr hoher Enzymkonzentrationen stagnierte die Differenz zwischen den Zählraten mit und ohne PLP. Günstig schien es, möglichst geringe Enzymaktivität einzusetzen, da hierdurch die Leerwerte relativ stark absanken. Es wurden deshalb statt 1,5 U nur 0,5 U pro Analyse eingesetzt.

Es zeigte sich hier allerdings, daß trotz der geringeren Enzymaktivität im Ansatz der Bereich, innerhalb dessen die Decarboxylierungsrate proportional zu der zugegebenen PLP-Menge war, eine relativ geringe Spannweite aufwies (bis etwa 0,9 ng/ml PLP, siehe Abb.7, B).

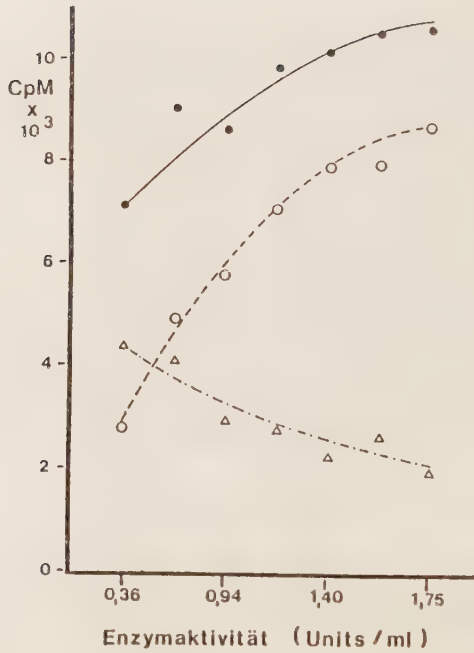


Abb. 6 : Vergleich von Leerwert und Zählwert nach PLP-Zugabe bei steigenden Enzymaktivitätskonzentrationen im Assaymedium .

(○) : Leerwerte

(●) : Zählwerte nach Zugabe einer konstanten PLP-Konzentration.

(Δ) : Zählwert minus Leerwert

(nach Endres, unveröffentlichtes Ergebnis.)

Tabelle 1 : Vergleich der Konzentrationen im Analysenansatz bei der Originalmethode und den Modifikationen

Methode nach Reinken (siehe Eichgerade A in Abb. 7)

Substanz	Konzentration der Stammlösg.	Volumen	Konzentration im Anal.-Ansatz
TDC	10 mg/ml	300 µl	860 mU/ml
Tyrosin	0,9 mg/ml	} 250 µl	0,7 mM
¹⁴ C-Tyrosin	40 nCi/ml		5,7 nCi/ml
PLP		100 µl	0 - 1,4 ng/ml
Na-Ac-Puffer	0,1 M	1100 µl	
Gesamtvolumen		1750 µl	

Modifikation nach Endres (unveröffentlicht, siehe Eichgerade B in Abb. 7)

Substanz	Konzentration der Stammlösg.	Volumen	Konzentration im Anal.-Ansatz
TDC	10 mg/ml	100 µl	360 mU/ml
Tyrosin	0,9 mg/ml	} 250 µl	0,9 mM
¹⁴ C-Tyrosin	40 nCi/ml		7 nCi/ml
PLP		50 µl	0 - 2,1 ng/ml
Na-Ac-Puffer	0,1 M	1000 µl	
Gesamtvolumen		1400 µl	

2. Modifikation (siehe Eichgerade C in Abb. 7)

Substanz	Konzentration der Stammlösg.	Volumen	Konzentration im Anal.-Ansatz
TDC	10 mg/ml	100 µl	230 mU/ml
Tyrosin	0,9 mg/ml	} 1000 µl	2,3 mM
¹⁴ C-Tyrosin	40 nCi/ml		18,6 nCi/ml
PLP		50 µl	0 - 1,9 ng/ml
Na-Ac-Puffer	0,1 M	1000 µl	
Gesamtvolumen		2150 µl	

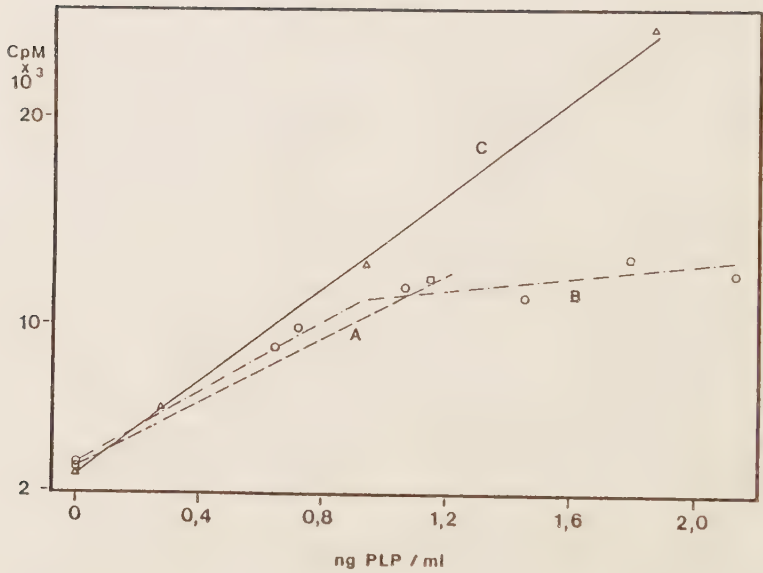


Abb. 7 : Eichgeraden für die radioenzymatische PLP-Bestimmung mit Tyrosindecaboxylase nach Reinken
 Gerade A : Eichgerade nach der Originalarbeit von Reinken
 Gerade B : Eichgerade der modifizierten Methode nach Endres (siehe Tabelle 1)
 Gerade C : Eichgerade der 2. Modifikation (siehe Tabelle 1)

Dies wurde auf einen zu geringen Überschuß von Tyrosin im Reaktionsmedium zurückgeführt. Die Michaeliskonstante der Tyrosincarboxylase für Tyrosin liegt bei 1,66 mM (165), die Tyrosinkonzentration im Ansatz betrug jedoch lediglich 0,7 mM. Da gesättigte Tyrosinlösung als Substrat der Reaktion zugesetzt wurde, konnte nur durch Zugabe eines größeren Volumens der Substratlösung die Tyrosinkonzentration im Ansatz erhöht werden, was das Gesamtvolumen des Testansatzes und damit den Verdünnungsfaktor für die Probe erhöhten. Statt 250 µl Tyrosinlösung wurden nun 1000 µl eingesetzt (Tyrosinkonzentration im Ansatz: 2,3 mM). Damit war die in Abb.7 gezeigte Eichgerade C zu erzielen. Die Nachweisgrenze betrug etwa 1,0 ng PLP pro ml Probe.

In Tabelle 1 ist die Zusammensetzung des Reaktionsmediums der Originalmethode nach Reinken denjenigen der oben genannten Modifikationen gegenübergestellt. Abb.7 zeigt die dazugehörigen Eichgeraden.

2.3.2 Nachteile der Meßmethode

Die Handhabung der in der Methode von Reinken benutzten Erlenmeyerkolben gestaltete sich in der Praxis relativ unbequem. Um eine sichere Durchmischung des Reaktionsmediums auf dem Boden des Kolbens zu erreichen, war die Inkubation im Wasserbad eines Schüttelinkubators notwendig. Durch das Fassungsvermögen der vorhandenen Inkubatoren war die maximale Zahl von Ansätzen pro Tag auf etwa 30 begrenzt. Da jeweils eine Standardgerade und Leerwerte pro Testreihe mitbestimmt werden müssen, war die Zahl von Patientenproben auf etwa 10 beschränkt, wenn Duplikatmessungen durchgeführt wurden.

Bei der Methode war zwar die Anschaffung von kostenintensiven Einwegmaterialien zum Auffangen von CO₂ vermieden, jedoch bereitete die notwendige Reinigung und Trocknung der Erlenmeyerkolben und Innengefäße erheblichen Zeitaufwand.

Ein entscheidender Nachteil des Tests waren die Fehlermöglichkeiten, die ihn neben der niedrigen Tagesleistung als für den Routinebetrieb ungünstig erscheinen ließen. Zum Stoppen der Reaktion und Einbringen des CO₂-Absorbens war es notwendig, den Verschlußstopfen mit Hamilton-Spritzen zu durchstechen. Wegen des durch die Injektion entstehenden Überdrucks im Kolben trat dabei häufig Gas aus. Dem möglichen Verlust von gebildetem CO₂ konnte nicht durch Injektion von Hyamin vor Reaktionsbeginn vorgebeugt werden, da es während der Inkubationszeit eindampfte.

Schließlich war die quantitative Überführung des Hyamins in die Szintillationsflüssigkeit problematisch und zeitraubend, da das Innengefäß mit Eppendorfpipetten auspipettiert und mit Szintillator gespült werden mußte. Sowohl Hyamin als auch der Szintillationscocktail ließen sich nur schwer, also mit Verlusten in der Pipettenspitze, pipettieren.

Die genannten Unsicherheiten führten häufig zu unbefriedigend großen Streubreiten bei Mehrfachbestimmungen und zahlreichen nicht verwertbaren Ausreißern.

Die mit dieser Methode erreichbare Nachweisgrenze von 1,0 ng PLP pro ml Probe erwies sich außerdem als zu hoch für die beabsichtigten Messungen von PLP im Urin.

2.3.3 Möglichkeiten für eine Weiterentwicklung des Tests und Erwartungen an die modifizierte Methode

Es war beabsichtigt, Verbesserungen in den genannten Punkten auf folgenden Wegen zu erreichen:

- a) Die mit den vorhandenen Mitteln fehleranfällige CO_2 -Bestimmung sollte zugunsten des Nachweises von radioaktivem Tyramin eliminiert werden.
- b) Die Sensitivität des Tests sollte durch zwei Veränderungen erhöht werden:
 - Verringerung der eingesetzten Enzymaktivität, um geringeren Einfluß durch den PLP-Gehalt des Enzympräparats zu haben;
 - Verwendung eines Tyrosinpräparats mit höherer spezifischer Radioaktivität.
- c) Die Methode sollte miniaturisiert werden, um sie in Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchführen zu können und die Vorteile der einfacheren Handhabung und höheren Anzahl möglicher Tests nutzen zu können.

3. CHEMIKALIEN

L - (Ring-3,5-³H) - Tyrosin : New England Nuclear , Boston.

(7- ¹⁴C) - Tyramin-Hydrochlorid : Amersham Buchler , Braunschweig.

L - (carboxyl- ¹⁴C) - Tyrosin : Amersham Buchler , Braunschweig.

L- Tyrosin Apodecarboxylase , L- Tyrosin : Sigma Chemie, München.

Pyridoxal-5'-Phosphat , Pyridoxamin , Pyridoxal , Pyridoxin , Pyridoxaminphosphat : Sigma Chemie, München .

ATP , Zinkhydrochlorid , Humanalbumin : Sigma Chemie, München.

Pyridoxinphosphat : Merck, Darmstadt.

Trichloressigsäure , Perchlorsäure , Metaphosphorsäure , Sulfosalicylsäure : Merck, Darmstadt.

Weitere Chemikalien kamen von Merck , Darmstadt und Boehringer Mannheim .

DEAE-Cellulose , Kapazität 0,90 meq/gm , fine : Sigma Chemie, München und Serva Feinbiochemica, Heidelberg .

Szintillator : Quickszint 405 , Zinsser , Frankfurt.

Flüssigkeitsszintillationszähler : Searle Analytic Inc. Modell 115.

4. ENTWICKLUNG EINER MODIFIKATION DER NACHWEISMETHODE

4.1 Reaktionsgleichung

Statt des am Carboxylkohlenstoff markierten Tyrosins wird solches verwendet, das am Sechsring zwei Tritiumatome trägt, das heißt, auch das gebildete Tyramin ist radioaktiv markiert und kann durch Szintillationszählung nachgewiesen werden. Im Prinzip ist dies also die von Hamfelt et al. angegebene Methode, bei der allerdings uniform ^{14}C -markiertes Tyrosin verwendet wurde. Die spezifische Radioaktivität des tritiierten Tyrosins ist etwa 900 mal so groß wie die des ^{14}C -Tyrosins. (Abb.8).

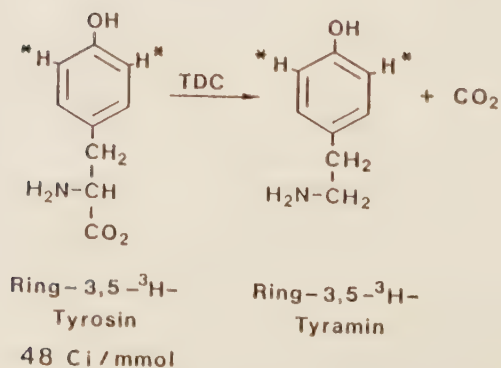
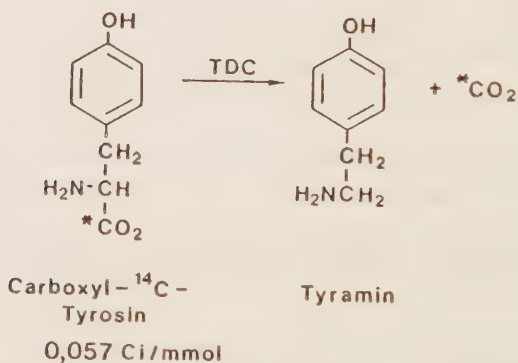


Abb. 8 : Reaktionsgleichungen bei Verwendung von Carboxyl- ^{14}C -Tyrosin und 3,5- ^3H -Tyrosin als Substrat.

4.2 Säulenchromatographische Trennung von Tyrosin und Tyramin

4.2.1 Wahl des Adsorbens

Zur Auswahl eines Trennverfahrens für bestimmte Substanzgemische sind zunächst die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Stoffe, aufgrund derer sie getrennt werden können, und damit die Rahmenbedingungen für die Trennung zu untersuchen.

In diesem Fall handelte es sich um eine Aminosäure mit aromatischer, hydrophober Seitenkette und ihr Amin, die getrennt werden sollten.

Diese Tatsache schloß z.B. die Trennung aufgrund unterschiedlicher Molekülgröße, wie etwa die Molekularsiebchromatographie, aus.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Trennung ist das Protolysengleichgewicht der Aminosäuren.

Tyrosin besitzt drei schwache Säurefunktionen, neben der α -Carboxylgruppe und der α -Aminogruppe noch eine phenolische Hydroxylgruppe in 4-Stellung am Sechsring (Abb.9.1). Der isoelektrische Punkt bei Tyrosin liegt beim arithmetischen Mittel der pK-Werte der α -Amino- und der Hydroxylgruppe, also bei etwa 9,95. Bei pH-Werten kleiner als 9,95 ist die Hydroxylgruppe ungeladen, die Aminogruppe trägt die Ladung + 1, die sich mit der negativen Ladung der α -Carboxylgruppe (pK $2,1 \pm 0,5$) zur Nettoladung 0 ausgleicht (74).

Beim Tyramin fehlt die α -Carboxylgruppe, der isoelektrische Punkt berechnet sich wie beim Tyrosin zu 9,95. Bei pH-Werten kleiner als 9,95 ist die Nettoladung also + 1 wegen der protonierten Aminogruppe (Abb.9.2).

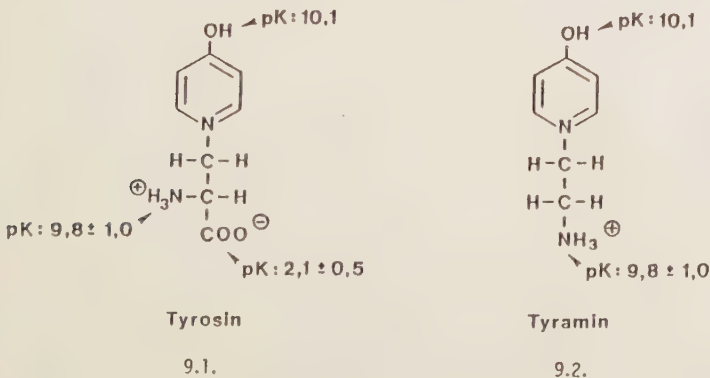


Abb. 9 : Dissoziationskonstanten von Tyrosin und Tyramin

Die pH-abhängigen Ladungsunterschiede der Aminosäuren werden in der Ionenaustauschchromatographie zu ihrer Trennung verwendet. Hierbei werden Aminosäurengemische, wie sie z.B. in Körperflüssigkeiten vorkommen, durch Bindung an eine anionische Matrix und Elution mit Puffern von steigendem pH-Wert getrennt. In sauren Lösungen liegen die Aminosäuren als Kationen vor, bilden also mit den Anionengruppen des Ionenaustauschers Salze. Bei steigendem pH des Elutionsmittels werden die Aminosäuren, entsprechend ihrem pK-Wert, bei verschiedenen pH-Werten in die Zwitterionform übergeführt und erscheinen nacheinander im Eluat.

In unserem Fall vereinfacht sich die Aufgabenstellung dahingehend, daß nur zwei Aminosäuren voneinander getrennt werden müssen, das heißt die Bindung einer Aminosäure an den Ionenaustauscher soll möglichst vollständig und die der anderen am besten überhaupt nicht eintreten. Grundgedanke der hier gezeigten Trennmethode war, daß sich die Separation der beiden Aminosäuren durchführen lassen müßte mit

- a) Ionenaustauschersäulen geringer Länge, und damit
- b) hoher Durchflußrate
- c) geringer Elutionsdauer
- d) großer Anzahl gleichzeitig durchführbarer Trennvorgänge
- e) geringem Verbrauch von Ionenaustauscher.

Das hierfür getestete Material war Ionenaustauschcellulose. Dieser Ionenaustauscher setzt sich zusammen aus wasserunlöslichen Polysaccharid-Ketten von in 1→4-Bindung verknüpften Glukosemolekülen, den an diese Grundstruktur gebundenen funktionellen Gruppen und ihrem Gegenion. Die Polysaccharidketten sind durch Wasserstoffbrücken quervernetzt und bilden so die typische Matrix des Austauschers. An diese Matrix werden die funktionellen Gruppen gebunden, am häufigsten sind folgende:

SO_3^-	stark sauer	Kationenaustauscher
COO^-	schwach sauer	
NR_3^+	stark basisch	Anionenaustauscher
NHR_2^+	schwach basisch	

Wie oben gezeigt besitzt Tyrosin bei pH-Werten zwischen 2,1 und 9,9 die Nettoladung 0, aber eine negativ geladene Carboxylgruppe, Tyramin eine positiv geladene Aminogruppe. Die Trennung von Tyrosin und Tyramin kann also erreicht werden durch Bindung der anionischen Carboxylgruppe von Tyrosin an einen Anionenaustauscher, während Tyramin nicht gebunden wird.

Es schieden also Kationenaustauscher für die Trennung aus, ebenso wurden stark basische Cellulosen zunächst nicht in Betracht gezogen, da es sich bei den Aminosäuren um schwache Säuren handelt.

In Frage kam z.B. ein schwach basischer Austauscher wie die DEAE-(Di-Ethyl-Amino-Ethyl)-Cellulose. Deren funktionelle Gruppe ist in Abb.10 gezeigt.

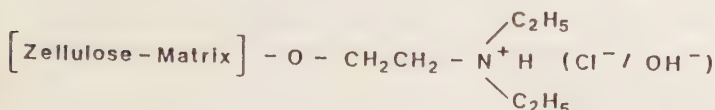


Abb. 10 : Chemische Struktur des Ionenaustauschers (118)

Vor der Verwendung wird die Cellulose so aufbereitet, daß sie Gegenionen an die funktionellen Gruppen bindet, die dann ausgetauscht werden können. Im Fall der DEAE-Cellulose, die eine Aminogruppe als Festion besitzt, sind die Gegenionen z.B. OH^- oder Cl^- . Es besteht ein grundlegender Unterschied zwischen der OH^- -Form der Cellulose und den Formen mit anderen Gegenionen: Bei der OH^- -Form liegt das Festion als dissoziierte Base vor, wenn Chlorid- oder Phosphationen als Gegenion gebunden sind, als unlösliches Salz.

Die Fragestellung war nun:

- Bindet eine Form der DEAE-Cellulose Tyrosin?
- Beeinflussen der pH-Wert und die Ionenstärke des Startmediums die Bindung?
- Wird Tyramin quantitativ eluiert?

4.2.2 Bedingungen der Bindung von Tyrosin an DEAE-Cellulose

In einem Vorversuch wurden Cellulosepräparationen mit Chlorid- und Phosphatgruppen als Gegenion und Cellulose in der dissoziierten Form (OH^- -Form) getestet. Dabei zeigte sich, daß Tyrosin nur durch die OH^- -Form der Cellulose gebunden werden konnte. Die weiteren Versuche wurden mit dieser Cellulose durchgeführt.

Um die Frage b) und c) zu beantworten, wurden Versuche durchgeführt, die an den für die Enzymreaktion notwendigen Bedingungen orientiert waren. Das heißt, es mußte überprüft werden ob die für die Separation günstigsten Bedingungen:

- a) möglichst geringe Puffermolarität, da dann die Affinität zu Tyrosin am größten ist
- b) pH-Wert des Elutionsmittels im effektiven Bereich der Cellulose

vereinbar sind mit den Eigenschaften des Reaktionsmediums, in dem die Pufferkonzentration nicht allzu gering sein darf, um den optimalen pH-Wert für die Reaktion zu sichern, und in dem außerdem wegen der Deproteinisierung und Rücktitration auf optimalen pH höhere Salzkonzentrationen auftreten.

Für die Prüfung der Bedingungen für eine möglichst vollständige Bindung von Tyrosin an das Adsorbens wurde folgendes Testschema verwendet:

Eine Lösung mit $0,17 \mu\text{Ci } ^3\text{H-Tyrosin}$ und $22,5 \mu\text{g}$ nicht markiertem Tyrosin wurde mit jeweils $500 \mu\text{l}$ Aqua bidest., $500 \mu\text{l}$ $0,05 \text{ M}$ Natriumacetatpuffer (Na Ac), und $500 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ M}$ Na Ac-Puffer versetzt. Hiervon wurden jeweils $200 \mu\text{l}$ auf Cellulosesäulen mit 1 cm^3 Volumen und $1,1 \text{ cm}$ Füllhöhe aufgetragen und mit Aqua bidest eluiert. Nach Abschluß der Elution mit H_2O wurde mit 150 mM HCl eluiert, um den gebundenen Anteil des Tyrosins zu erfassen.

Das Elutionsschema der Abbildung 11 zeigt das Ergebnis. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nicht alle drei Elutionskurven eingezeichnet, sondern nur diejenige für den Versuch mit $0,05 \text{ M}$ Na Ac-Puffer (durchgezogene Linie).

Die Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse aller drei Testläufe. Es wird dabei verglichen, wie groß der Anteil des unerwünschterweise in der Wasserfraktion eluierten Tyrosins bei verschiedenen Pufferkonzentrationen der

Probe ist.

Tabelle 2 : Elution von Tyrosin mit H₂O und HCl auf DEAE-Cellulose

Probenmolarität	% der Gesamtaktivität in den Elutionsfraktionen			
	2,5 ml H ₂ O	5,0 ml H ₂ O	7,5 ml H ₂ O	2,5 ml HCl
Aqua dest.	3,6	0,5	0,1	95,6
0,05M Na-Ac.-Puf.	3,6	0,7	0,1	95,3
0,1M Na-Ac.-Puf.	6,1	0,5	0,2	92,7

Man konnte davon ausgehen, daß in dem Versuchslauf, bei dem lediglich Wasser als "Reaktionsmedium" verwendet wurde, der Anteil der Gesamtaktivität, der in der Wasserfraktion eluiert wurde zum größten Teil auf Verunreinigung des radioaktiven Tyrosins oder den natürlichen Zerfall der Tyrosinmoleküle in der Stammlösung zurückzuführen ist. Möglicherweise tritt auch eine Bindung von Tyrosin an Cellulosepartikel ein, die nicht fest mit der Matrix verbunden sind und eluiert werden. Dieser Anteil betrug 4,2 %.

In dem Lauf, der die Bedingungen des Reaktionsmediums nachahmen sollte, (0,05 M Na Ac-Puffer) war der nicht gebundene Anteil 4,4 %, unterschied sich also kaum von der unter Optimalbedingungen unvermeidlich eluierten Tyrosinmenge.

Im Lauf Nr. 3 (0,1 M Na Ac-Puffer) betrug der nicht gebundene Anteil 6,9 %.

Dies zeigte, daß die Kapazität der Cellulose bei einer Pufferkonzentration von unter 0,1 M nicht überbelastet sein würde. Zu bemerken ist, daß das Probenvolumen bei dem Test mit 200 µl sehr groß gewählt wurde. Da die für den Reaktionsablauf günstigste Pufferkonzentration ca. 0,1 - 0,2 M ist, mußte es möglich sein, durch Verdünnung des Analysenansatzes nach Beendigung der Reaktion oder die Auftragung einer kleineren Menge des Reaktionsmediums auf die Säule diese Erfordernis der Trennmethode zu erfüllen.

4.2.3 Bedingungen der Elution von Tyramin

Der Nachweis einer quantitativen Elution von Tyramin wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Aus Kostengründen wurde zunächst nur nicht-markiertes Tyramin für die Versuche verwendet.

Die aromatischen Aminosäuren absorbieren ultraviolettes Licht mit einem Maximum bei 280 nm. Das Tyramin konnte also im UV-Spektrophotometer bei dieser Wellenlänge im Eluat nachgewiesen werden.

200 µl einer Tyraminlösung von 330 µg/ml in 0,1 M Na Ac-Puffer wurden auf die Säulen aufgetragen und mit Wasser eluiert.

In der Tabelle 3 ist die relative Transmission von 2 ml-Eluaten im Vergleich zu Eluaten dargestellt, die lediglich mit 0,1 M Na Ac-Puffer ohne Tyramin durchgeführt wurden. Die Transmission eines Gemischs von 200 µl Puffer + 2 ml H₂O wurde als 100 % gesetzt.

Tabelle 3 : Elution von Tyramin mit H₂O und HCl auf DEAE-Cellulose

Probe	Relative Transmission in %						
	vor dem Lauf	in den H ₂ O - Fraktionen				in der HCl-Frakt.	
		2 ml	4 ml	6 ml	8 ml	2 ml	
(a) Na-Ac.-Puf.	100	83	95	94	93	90	
(b) Tyramin in Na-Ac.- Puf.	61	73	70	90	93	83	
(a) - (b)	39	10	25	4	0	7	

Die Hauptmenge des eingesetzten Tyramins wird also in den Fraktionen 1 und 2 eluiert, mit einem Eluatvolumen von 6 ml war praktisch die gesamte eluierbare Menge ausgewaschen. Es fand sich allerdings in der HCl-Fraktion ein Anteil, der mit H₂O nicht eluierbar war.

Die gestrichelte Kurve des Elutionsdiagramms (Abb.11) und die Tabelle 4 zeigen die Elution von radioaktiv markiertem Tyramin. Die Pufferkonzentration bei diesen Versuchen war 0,05 M. Es wurden 0,1 µCi ¹⁴C-Tyramin pro Säule eingesetzt.

Tabelle 4 : Elution von Tyramin mit H₂O und HCl auf DEAE- Cellulose

Probenmolarität	% der Gesamtaktivität in den Elutionsfraktionen			
	2,5 ml H ₂ O	5,0 ml H ₂ O	7,5 ml H ₂ O	2,5 ml HCl
0,05 M Na-Ac.-Puf.	73,0	19,0	2,9	5,1

In einem Elutionsvolumen von 7,5 ml H₂O befinden sich 94,9 % der Gesamtaktivität, 5,1 % sind mit H₂O nicht eluierbar und erscheinen in der HCl-Fraktion.

Diese beiden Versuche zeigten, daß eine Trennung von Tyrosin und Tyramin im Reaktionsmedium auf unkomplizierte Weise mit DEAE-Cellulose durchgeführt werden kann. Cellulosesäulen von 1 cm³ Volumen bei 1,1 cm Füllhöhe reichten zur Trennung aus. Zur quantitativen Elution von Tyramin unter den oben genannten Bedingungen wurden 6 ml H₂O benötigt.

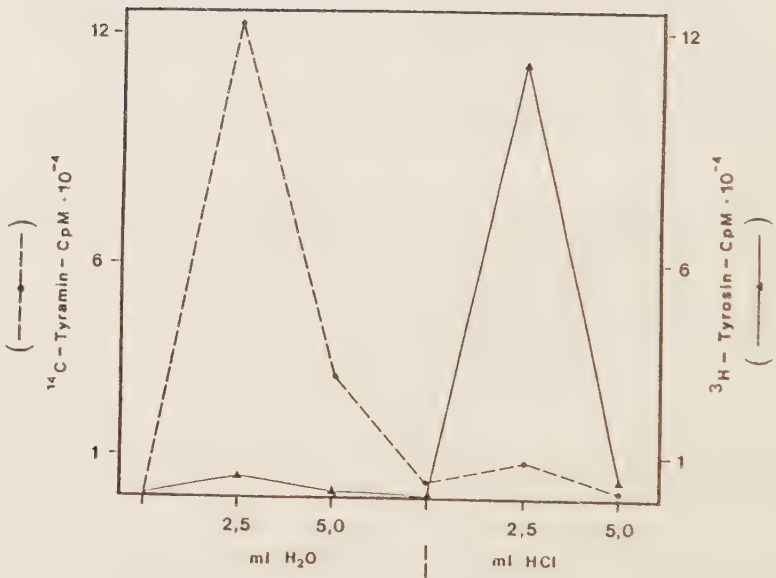


Abb. 11 : Elutionsdiagramm für Tyramin und Tyrosin auf DEAE-cellulose.

(---●---) : 0,1 μCi ^{14}C -Tyramin

(—▲—) : 0,17 μCi ^3H -Tyrosin

Cellulosevolumen : 1 cm^3 ; Füllhöhe : 1,1 cm ;

4.2.4

Aufbereitung der Cellulose

Die Cellulose in Pulverform wird mit einer möglichst großen Menge Aqua dest. (ca. 25 ml/g Cellulose) aufgeschlemmt, gut durchgerührt und dann stehengelassen. Der nutzbare, vernetzte Anteil der Cellulose sedimentiert schneller als die freien Feinpartikel. Diese können daher, nachdem sich die Cellulose abgesetzt hat, dekantiert werden. Je öfter diese Prozedur durchgeführt wird, desto weniger Feinpartikel befinden sich in der Cellulose und desto höher wird die erreichbare Durchflußrate sein.

Um die Cellulose in die Basenform überzuführen, wird sie ca. 30 Minuten lang in 1 N NaOH gerührt. (1 Teil Cellulose + 1 Teil 2 N NaOH). Danach läßt man die Cellulose wieder sedimentieren, was jetzt wesentlich länger dauert als in H_2O , da sie jetzt stärker gequollen ist. Sie wird solange durch Dekantieren des Überstands und Wiederauffüllen mit Aqua dest. gewaschen, bis der Überstand neutral ist. Sie muß noch auf den für den Trennlauf gewünschten pH gebracht und mit H_2O äquilibriert werden und ist dann verwendbar.

Diese Vorbereitungsschritte sind für die Qualität der Cellulose von Bedeutung. Je mehr Feinpartikel aus der Cellulose entfernt werden, desto höher ist die erreichbare Flußrate. Andererseits sinkt dadurch auch die Bindungskapazität der Cellulose. Dies gewinnt bei den kleinen hier verwendeten Säulenvolumina an Wichtigkeit. Das Augenmerk muß sich hier weniger auf die Durchflußgeschwindigkeit richten als auf die Bindungskapazität. Die Behandlung mit NaOH verlangt deshalb Aufmerksamkeit, da bei zu langer Einwirkungsdauer oder zu hoher Konzentration der Lauge die Cellulose hydrolysieren kann.

Im folgenden Versuch zur Überprüfung der Bindungskapazität wurde die gleiche Cellulosecharge benutzt. Ein Teil (Cellulose 1) wurde in 2 N NaOH 30 Minuten lang gerührt, vorher waren durch häufiges Waschen so viele Feinpartikel wie möglich entfernt worden. Ein anderer Teil (Cellulose 2) wurde 30 Minuten lang in 1 N NaOH gerührt. Der Waschvorgang zur Entfernung von Feinpartikeln war vorher nicht so intensiv durchgeführt worden wie bei Cellulose 1.

Zum Vergleich der Bindungskapazitäten wurden Proben von jeweils 200 μ l Volumen auf Säulen von 1 cm^3 Volumen und 1,1 cm Höhe aufgebracht. Diese Proben waren Lösungen von radioaktiv markiertem Tyrosin in Na Ac-Puffer verschiedener Molarität: 0,05, 0,1 und 0,25 M. Die Elution wurde mit Aqua dest. durchgeführt. In Tabelle 5 ist der Anteil der Gesamtradioaktivität gezeigt, der sich in der Wasserfraktion fand.

Tabelle 5 : ^3H -Tyrosin im H_2O -Eluat in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration der Probe.

Pufferkonzentration in der Probe	% der Gesamtradioaktivität im Eluat	
	Cellulose 1	Cellulose 2
0,05 M	5,2	3,2
0,10 M	9,2	3,3
0,25 M	16,0	4,3

Dies zeigt, daß bei den geringen hier benutzten Füllhöhen der Cellulosesäulen eine ausreichende Kapazität sichergestellt sein mußte, da sonst die Interferenz von in der Probe befindlichen Ionen mit der Bindung von Tyrosin zu verfälschten Zählraten führen konnte.

In der Literatur findet man Hinweise auf starke Qualitätsschwankungen der DEAE-Cellulose, einerseits bedingt durch verschiedene Herstellungsverfahren und Grundprodukte bei unterschiedlichen Herstellern, zum anderen aber auch bei verschiedenen Chargen des gleichen Herstellers (116). Es wurde deshalb vor Verwendung neuer Cellulosechargen jeweils ein Elutionsdiagramm erstellt, um veränderten Eigenschaften des Adsorbens durch Modifikationen des Trennlaufs begegnen zu können.

4.2.5 Titration der Cellulose

Nach Aufbereitung der Cellulose zur OH^- -Form und Spülen mit Aqua dest. liegt sie in destilliertem Wasser ungefähr mit dem pH-Wert 11,3 vor. Die Verwendung der Cellulose bei diesem pH-Wert ist ungünstig, da ihre Kapazität hier nur gering ist. Ihre Titrationskurve zeigt, daß zwei pK-Werte von funktionellen Gruppen vorliegen, nämlich 9,5 und 5,7. Da die Festionen positiv geladen sind, werden bei pH-Werten größer als 9,5 die geladenen Gruppen und damit die Kapazität schnell geringer. Es ist also im Hinblick auf eine möglichst vollständige Bindung von Tyrosin notwendig, den Trennvorgang bei einem pH kleiner als 9,5 ablaufen zu lassen (116). Ein zweiter Aspekt, der die Bedeutung des pH-Wertes für die Trennung zeigt, ist die Elution von Tyramin. Wie aus Abb.9.2 ersichtlich ist, liegt die phenolische Hydroxylgruppe von Tyramin bei dem pH der untitrierten Cellulose von 11,3 in der dissoziierten Form vor und die α -Aminogruppe ist ungeladen. Wegen der resultierenden Nettoladung von - 1 wird Tyramin unter diesen Bedingungen unerwünschterweise ebenfalls an das Adsorbens gebunden. Unterhalb des isoelektrischen Punkts von Tyramin ($9,9 \pm 1,0$) ist die Nettoladung +1 und die Elution wird damit möglich sein.

Die Abb.12 zeigt Elutionsdiagramme für Tyramin bei verschiedenen pH-Werten der Cellulose.

Bei pH 11,3 ist sogar mit einem Volumen von 16 ml H_2O keine vollständige Elution von Tyramin zu erreichen, bei einem pH von 9,3 ist es mit ca. 5 ml H_2O praktisch vollständig eluierbar.

Für die Praxis wurde angestrebt, eine quantitative Elution von Tyramin mit 3,5 - 4,0 ml H_2O zu erreichen, da das Eluat direkt in Szintillationsgefäßen aufgefangen und mit Szintillator gemischt werden sollte. Da die Wasseraufnahmekapazität der gebräuchlichen Szintillatoren ca. 20 % beträgt und das Fassungsvermögen der Vials 22 ml, ergaben sich maximal 4 ml als oberste Grenze des Eluatvolumens, wenn vermieden werden sollte, die Radioaktivitätsmessung in zwei Fraktionen durchzuführen. Dies war durch Titration der Cellulose auf pH 8,7 - 8,9 möglich. Das benötigte Elutionsvolumen betrug dann ca. 3,6 ml.

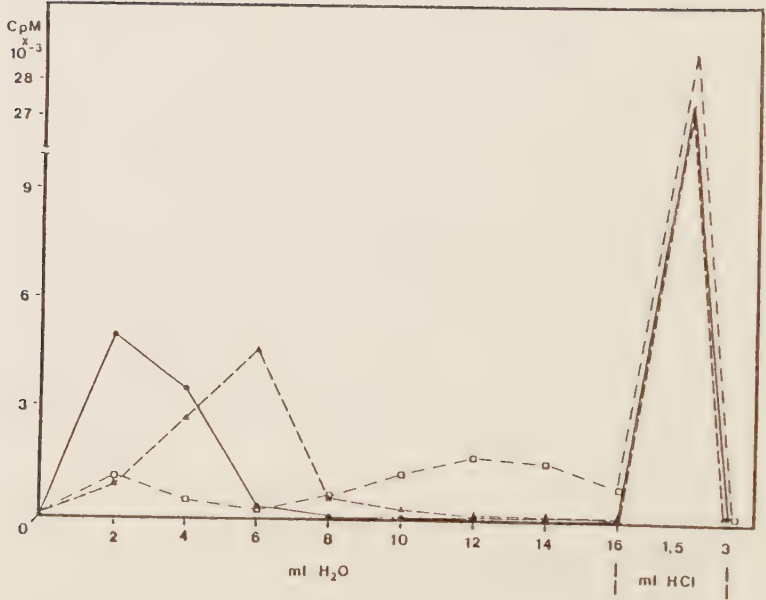


Abb. 12 : Elution von Tyramin bei verschiedenen pH-Werten der DEAE-Cellulose.

(—●—) : Elution bei pH 9,3 .

(—▲—) : Elution bei pH 10,3 .

(—□—) : Elution bei pH 11,3 .

Die Cellulose wurde zur Titration in einem Becherglas 1:1 mit Aqua bidest. versetzt und die Titration mit 150 mM HCl während intensiven Rührens durchgeführt. Die pH-Messung erfolgte mit einer Glaselektrode mit KCl-Bezugslösung.

4.2.6 Ablauf des Trennvorganges

Aus 2,5 ml-Kunststoffinjektionsspritzen wird der Stempel entfernt. Am Kanülenkonus werden die Spritzen mit einer etwa 1 mm dicken Lage von Glaswolle ausgefüllt, die wasserdurchlässig ist, aber Cellulose zurückhält. Die Spritzen werden in eine Haltevorrichtung gehängt, die 50 Stück aufnehmen kann und eine Elution direkt in Szintillationsgefäße ermöglicht (Abb.13). Anschließend werden die Säulen mit Pasteurpipetten mit 1 cm³ Cellulose gepackt und mit 2,5 ml H₂O äquilibriert.

50 µl des zentrifugierten Reaktionsmediums werden mit einer Eppendorfpipette auf die Säulen aufgetragen. Nachdem die Probe eingezogen ist, wird mit 3,6 ml H₂O eluiert. Das Eluat wird direkt in Szintillationsgefäßen aufgefangen.

4.3 Szintillationszählung

Zu 3,6 ml Eluat werden 18 ml Szintillator gegeben. Die Szintillationsgefäße werden verschlossen und gut geschüttelt. Sie werden vor dem Zählvorgang mindestens 60 Minuten lang stehengelassen. Es wird ein kommerziell angebotener Szintillator verwendet, der Toluol, PPO und POPPOP enthält sowie Triton X-100 als Surfactant (Zinsser).

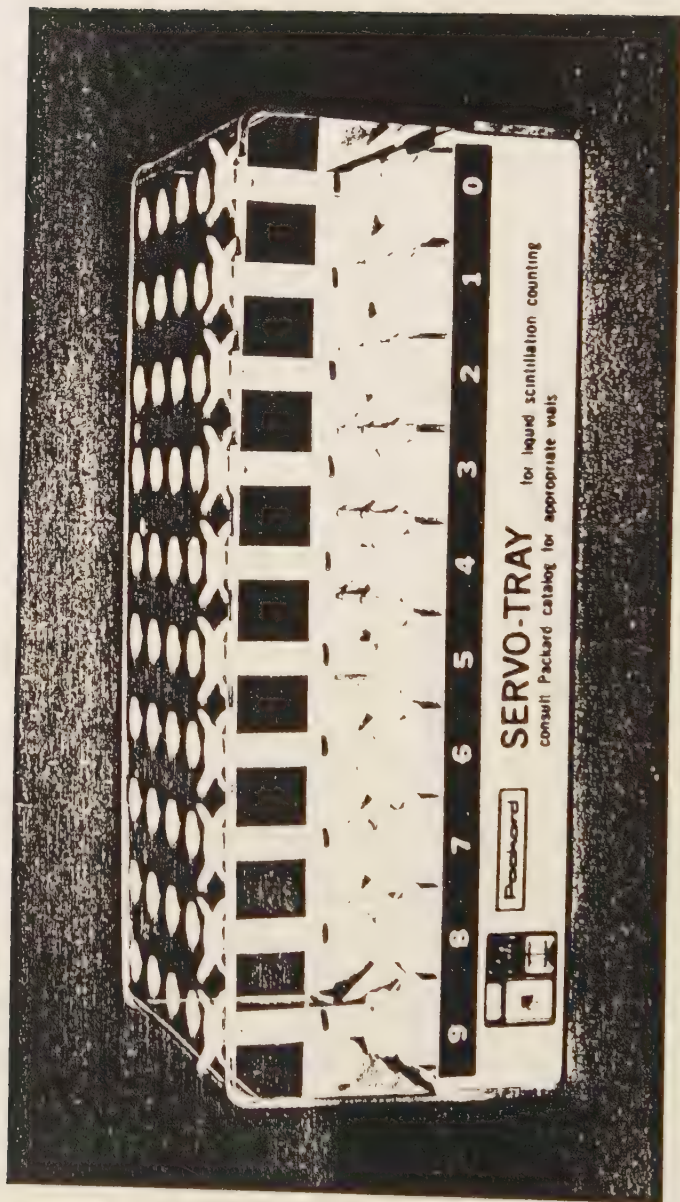


Abb. 13 : Anordnung für 50 simultane Trennläufe auf Mini-DEAE-Cellulose-Säulen unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Halters für Szintillationsgefäße und 2 ml-Injektionsspritzen. Die Striche auf den Spritzen geben die Füllhöhe der Cellulose an. Am Boden der Spritzen ist die "cellulose-dichte" Glaswollschicht zu erkennen. Nach Shin-Buehring et al. (138, 139)

4.4 Optimierung der Reaktionsbedingungen

4.4.1 Verkleinerung des Analysenansatzes

Bei der Methode von Reinken war das minimale praktikable Volumen des Reaktionsmediums etwa 1,5 ml, da bei kleineren Volumina in den Erlenmeyerkolben keine sichere Durchmischung mehr gegeben war. Der Analysenansatz sollte nun soweit verkleinert werden, daß er im Eppendorfgeläß durchgeführt werden konnte. Als Gesamtmenge des Reaktionsmediums wurden daher etwa 300 µl angestrebt.

Wegen der höheren spezifischen Radioaktivität von ^3H -Tyrosin konnte erwartet werden, daß bei dessen Verwendung kleinere Konzentrationen im Ansatz notwendig seien, und damit geringere Enzym- und Coenzymaktivität pro Analyse.

Ein Vorversuch sollte auf die für den Routinebetrieb verwendbaren Konzentrationen hinführen. Es wurde bei diesem Versuch etwa 1/7 der Enzymaktivitätskonzentration eingesetzt, die bei dem modifizierten Ansatz nach Reinken angewendet wurde. Die Substratkonzentration betrug etwa 1/3. Die Substanzkonzentration des radioaktiven Tyrosins war bei Verwendung des ^3H -Tyrosins weit geringer als bei ^{14}C -Tyrosin, wegen der größeren spezifischen Aktivität von ^3H -Tyrosin war die Radioaktivitätskonzentration pro Ansatz jedoch etwa 90 mal so groß wie bei ^{14}C -Tyrosin. Um die Kinetik der Reaktion einschätzen zu können, wurden sehr hohe PLP-Konzentrationen im Ansatz verwendet (0 - 10 ng/ml).

In Tabelle 6 sind die Zusammensetzungen der Reaktionsmedien des ursprünglichen Analysenansatzes und der miniaturisierten Methode gegenübergestellt.

Tabelle 6 : Vergleich der Konzentrationen im Analysenansatz bei der ^{14}C -Tyrosin- und der miniaturisierten ^3H -Tyrosin-Methode

^{14}C -Tyrosin-Methode (2. Modifikation, siehe Tabelle 1, Seite 19)

Substanz	Konzentration der Stammlösg.	Volumen	Konzentration im Anal.-Ansatz
TDC	10 mg/ml	100 μl	230 mU/ml
Tyrosin	0,9 mg/ml	} 1000 μl	2,3 mM
^{14}C -Tyrosin	40 nCi/ml		18,6 nCi/ml
PLP		50 μl	0 - 1,9 ng/ml
Na-Ac-Puffer	0,1 M	1000 μl	
Gesamtvolumen		2150 μl	

^3H -Tyrosin-Methode (Vorversuch , siehe Abb. 14)

TDC	0,5 mg/ml	20 μl	36 mU/ml
Tyrosin	0,45 mg/ml	} 100 μl	0,8 mM
^3H -Tyrosin	5000 nCi/ml		1660 nCi/ml
PLP		100 μl	0 - 10 ng/ml
Na-Ac-Puffer	0,1 M	80 μl	
Gesamtvolumen		300 μl	

Die gestrichelte Kurve der Abb.14 zeigt die Zählrate gegenüber den eingesetzten PLP-Konzentrationen. Aus der Abflachung der Kurve geht hervor, daß innerhalb der Reaktionszeit von 15 Minuten das vorhandene Substrat zu einem großen Teil umgesetzt wurde, wenn die PLP-Konzentration größer als 3 ng/ml war.

Rechnerisch stellt sich dies so dar:

Bei einer eingesetzten Radioaktivität von 0,5 μCi ($1,1 \times 10^6$ DpM) war die 100 % Zählrate $39,0 \times 10^4$ CpM. Das entspricht einer Zählausbeute von 35 %. Die Zählrate nach 15 Minuten für den Reaktionsablauf mit 10,0 ng/ml PLP betrug $22,8 \times 10^4$ CpM, also waren knapp 60 % des Substrats zu diesem Zeitpunkt umgesetzt.

Die eingesetzte Enzymaktivität pro Analyse betrug 0,011 U. 1 U des Enzyms setzt in 1 Minute 1 μmol CO_2 frei, das heißt es wird 1 μmol Tyrosin decarboxyliert. In 15 Minuten decarboxylieren also 0,011 U des Enzyms mindestens 0,165 μmol Tyrosin, wenn PLP im Überschuß vorhanden ist. Die eingesetzte Substratmenge betrug 0,250 μmol . Theoretisch müßten also 66 % des Substrats zu Tyramin umgesetzt sein.

Die Berechnung bestätigt also das aus der Reaktionskurve der Abb.14

ersichtliche Ergebnis, das zeigt, daß die für den ursprünglichen Essay notwendigen Coenzymkonzentration von bis zu 2 ng/ml bei der modifizierten Methode zu groß waren. Bei einer PLP-Konzentration von 1 ng/ml betrug die Zählausbeute ca. 7×10^4 CpM. In diesem Bereich verlief die Eichkurve allerdings schon nicht mehr linear. Man konnte erwarten, daß unter diesen Bedingungen die Reaktionsgeschwindigkeit bis etwa 0,1 ng/ml PLP konstant verlaufen und hierbei eine ausreichende Zählrate von mindestens $0,7 \times 10^4$ CpM erreichbar sein würde.

Die weiteren Versuche zur Optimierung des Analysenansatzes wurden deshalb mit solch geringen PLP-Konzentrationen (0 - 0,15 ng/ml) durchgeführt.

4.4.1.1 Ermittlung optimaler Substanzkonzentrationen im Analysenansatz

Die folgenden Diagramme geben die Auswirkungen von Konzentrationsveränderungen der Reaktionspartner auf die Eichkurve bei sehr niedrigen PLP-Konzentrationen wieder. Diese Graphiken dienen als Grundlage für die Wahl der Konzentrationen im Routineansatz.

Es wurde in folgenden Bereichen variiert (Vergleich zu den Konzentrationen in den Vorversuchen):

	TDC	Tyrosin	PLP
¹⁴ C-Methode :	230 mU/ml	2,3 mM	0 - 1,9 ng/ml
³ H-Methode ; (Vorversuch)	36 mU/ml	0,8 mM	0 - 10 ng/ml
Optimierungstestläufe	20 - 200 mU/ml	0,012-0,42 mM	0 - 0,15 ng/ml

In allen Testläufen wurde die gleiche Konzentration von radioaktiv markiertem Tyrosin eingesetzt.

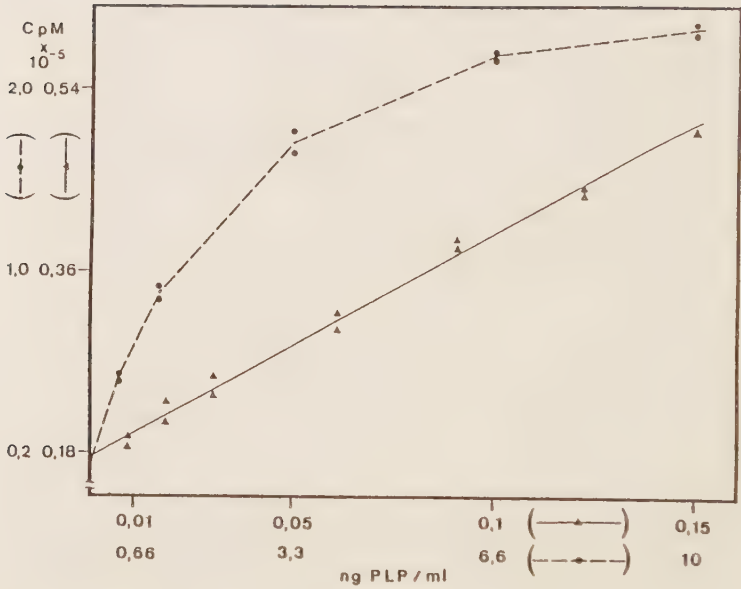


Abb. 14 : Eichkurven für den Reaktionsablauf mit ^3H -Tyrosin als Substrat.

(—●—) : Vorversuch mit 36 mU/ml Enzym , 0,8 mM Tyrosin , 1660 nCi/ml ^3H -Tyrosin.

(—▲—) : Eichgerade für den Routineansatz mit 40 mU/ml Enzym , 0,35 mM Tyrosin , 750 nCi/ml ^3H -Tyrosin.

Abb.15 zeigt den Einfluß steigender Enzymkonzentration auf die Eichkurve bei gleicher Substratkonzentration. Δ CpM steigt bei Verwendung der zehnfachen Enzymkonzentration lediglich um ca. 80 %, der Leerwert wird auf das dreifache erhöht. Entscheidend ist, daß die Eichkurve bei Verwendung von 200 mU/ml Enzym nur bis ca. 0,025 ng/ml PLP linear verläuft, bei 20 mU/ml bis ca. 0,1 ng/ml PLP. Bei der kleineren Enzymkonzentration ist also die Eichkurve in einem breiteren Bereich verwendbar, was bei den relativ großen Schwankungen des PLP-Gehalts in Blut und Geweben von Vorteil ist.

Die Eichkurve kann auch durch Variation des Konzentrationsverhältnisses zwischen radioaktiv markiertem und "kaltem" Tyrosin modifiziert werden. Je größer der Anteil des markierten Tyrosins ist, desto höher wird die Zählrate pro Einheit PLP. Prinzipiell ist es günstig, so geringe Mengen radioaktiven Substrats zu verwenden, wie möglich. Es gilt also, die Konzentration des kalten Tyrosins so zu wählen, daß genügend vorhanden ist, um die Reaktionsgeschwindigkeit während der gewählten Inkubationszeit konstant zu halten, aber nicht so viel, daß die Sensitivität des Tests, die um so kleiner wird, je größer die Konzentration des kalten Substrats ist, zu sehr absinkt. Im Grunde muß die Konzentration des Substrats bei Messungen der Enzymaktivität mit der Zweipunktmethode weit über der Michaeliskonstante liegen. Bei der Tyrosindecarboxylasemethode ist dies schwierig, da die Löslichkeit von Tyrosin lediglich 450 mg/l beträgt. Eine solche Lösung ist 2,5 mM. (K_m der Decarboxylase für Tyrosin ist 1,6 mM). Es ist zwar möglich, mehr Tyrosin in Lösung zu bringen durch Erwärmen oder Ansäuern, aber die Substratkonzentration im Reaktionsmedium wird nicht sehr viel höher als K_m liegen können. Besser ist es also, Enzym-, Coenzym-, Substratkonzentration sowie Reaktionsdauer so zueinander zu wählen, daß nur ein geringer Teil des Substrats umgesetzt wird und die Reaktionsgeschwindigkeit konstant verläuft auch bei geringen Substratkonzentrationen.

Abb.16 zeigt, daß dies bei Verwendung von 40 mU/ml Enzym, einer Tyrosinkonzentration von etwa 0,4 mM in einem Bereich der PLP-Konzentration bis etwa 0,1 ng/ml der Fall ist.

Bei einer Tyrosinkonzentration von 0,012 mM ist der Anteil von radioaktivem Tyrosin im Ansatz 0,5 %, bei 0,41 mM ist dieser Anteil 0,015 %.

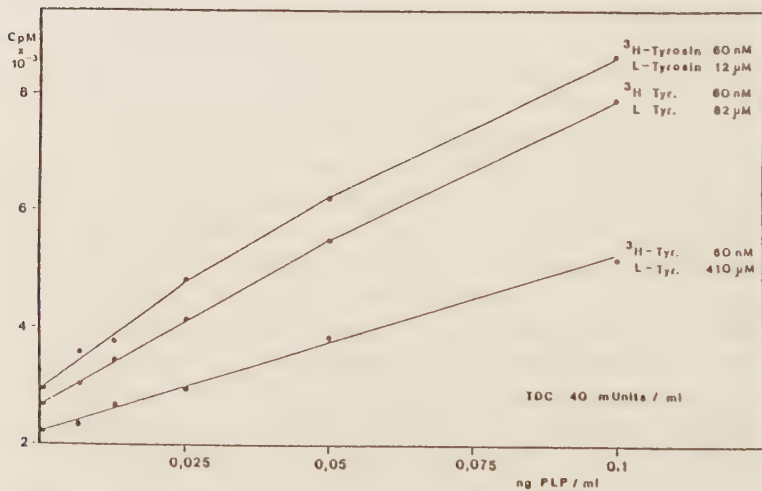
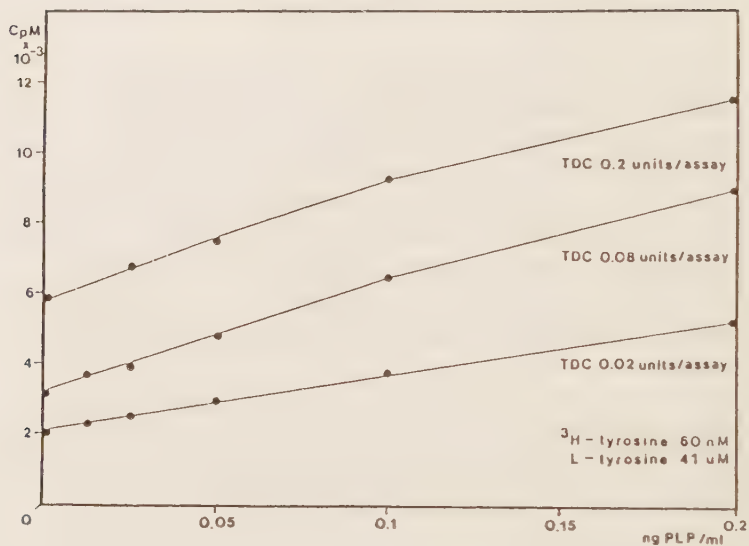


Abb. 15 : Eichkurven bei Variation der Enzymkonzentration im Analysenansatz

Abb. 16 : Eichkurven bei Variation der Substratkonzentration

Δ CpM ist bei der geringeren Tyrosinkonzentration etwa 2,5 mal so groß wie bei der höheren, aber die bessere Linearität der Eichkurve findet sich bei der höheren Substratkonzentration.

Die endgültigen für die Routineansätze gewählten Konzentrationen waren:

Substanz	Konzentration der Stammlösung.	Volumen	Konzentration im Ansatz
TDC	0,5 mg/ml	50 µl	40 mU/ml
Tyrosin	0,18 mg/ml	100 µl	0,35 mM
³ H-Tyrosin	2500 nCi/ml		750 nCi/ml
PLP		150 µl	0 - 0,15 ng/ml
Gesamtvolumen		300 µl	

Die Linearität des Reaktionsverlaufs bei diesen Konzentrationen wurde nun durch Variation der Coenzymkonzentration und Auftragung der Zählrate gegen die Reaktionsdauer überprüft. Aus Abb.17 ist ersichtlich, daß bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml PLP die Reaktionsgeschwindigkeit bis weit über den Stopzeitpunkt der Reaktion (15 Minuten) hinaus konstant ist. Zum Vergleich wurde der Zeitverlauf auch bei einer PLP-Konzentration von 1,0 ng/ml aufgezeichnet. Hier ist die Aktivität des gebildeten Holoenzym so groß, daß schon nach einigen Minuten die Reaktionsgeschwindigkeit absinkt, da ein zu großer Anteil des Substrats verbraucht ist.

Unter Verwendung der aus Abb.15 und 16 ermittelten Konzentrationen der Reaktionspartner ergab sich die Eichkurve B der Abb.14.

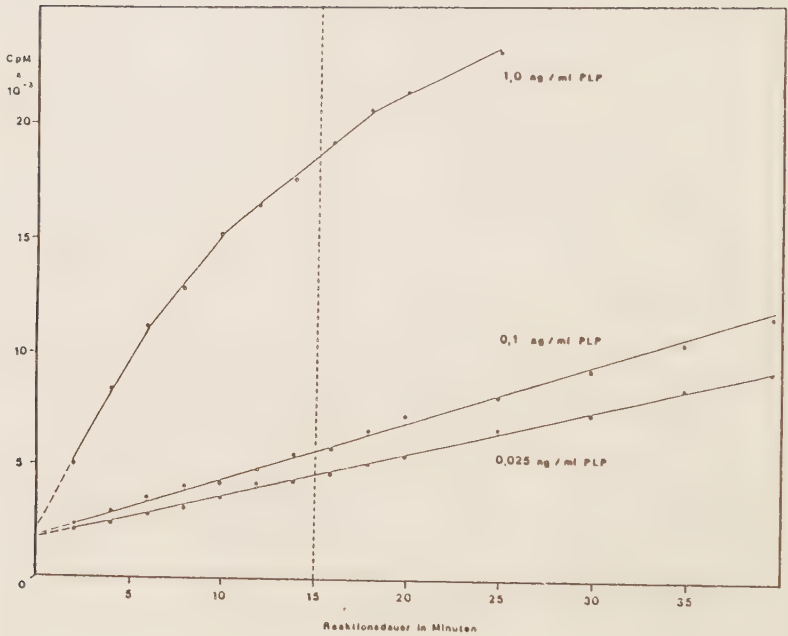


Abb. 17 : Überprüfung der Linearität des Reaktionsverlaufs innerhalb der Reaktionsdauer der Zweipunktmethode in Abhängigkeit von der vorhandenen PLP-Konzentration.

Simulation einer kontinuierlichen Meßtechnik durch Entnahme von Teilmengen aus inkubierten Proben alle 2 bzw. 5 Minuten.

4.4.2 Optimaler pH-Wert

Das pH-Optimum der Tyrosindecaboxylase liegt bei etwa 5,5 (61). Abb.18 wurde unter Verwendung von 0,1 M Na-Ac-Puffer erstellt. Die Enzymaktivität sinkt bei einem pH-Wert von 5,0 auf 45 % der Maximalaktivität ab, bei pH 6,0 auf ca. 70 %.

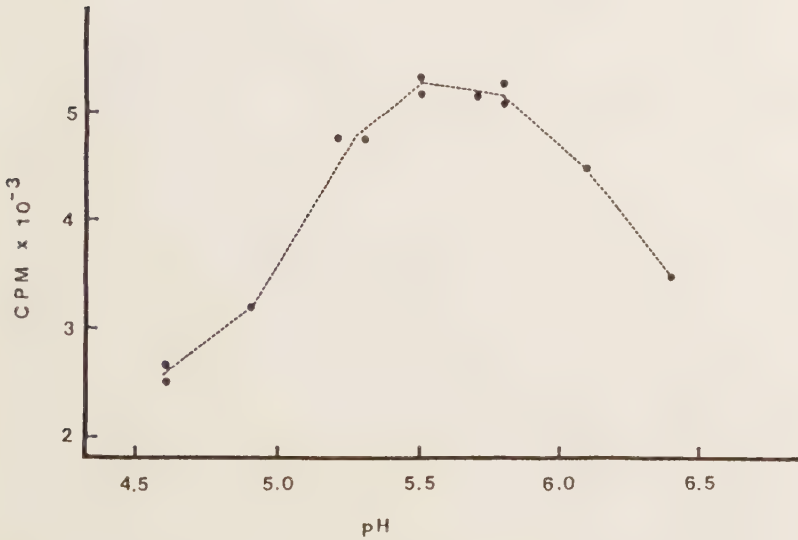


Abb. 18 : pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität

4.4.3

Einfluß der Puffermolarität

Wenige Autoren haben sich mit einer Optimierung der Pufferkonzentration für Decarboxylasereaktionen beschäftigt. Bei der Lysindecaboxylase fanden Gale und Epps einen Aktivitätsverlust bei Pufferkonzentrationen unter 0,1 M (Phosphatpuffer). Sie führten dies auf eine unzureichende Pufferung bei so niedrigen Konzentrationen zurück (61). Für die Aktivität der Tyrosindecaboxylase in Acetatpuffer verschiedener Molarität fanden wir folgenden Zusammenhang (Abb.19). Eine ungenügende Pufferung konnte hierbei ausgeschlossen werden, da jeweils vor und nach Beendigung der Reaktion der pH im Analysenmedium gemessen wurde.

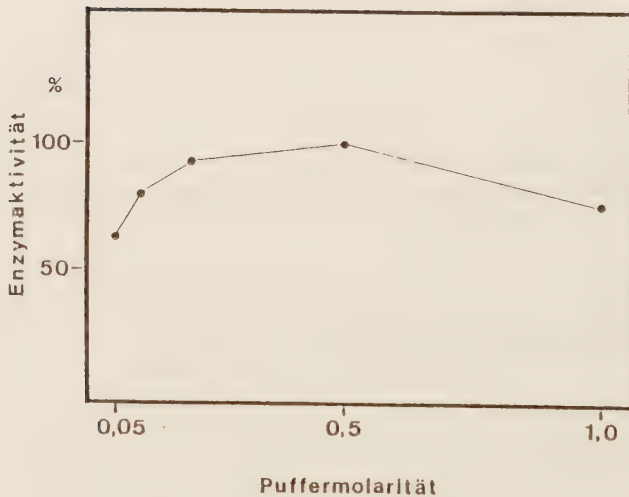


Abb. 19 : Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der Pufferkonzentration im Analysenansatz.

4.5 Ausführung des Meßansatzes

Blut- und Plasma-Proben: Diese werden wie unter 6.1 erläutert deproteiniert und mit Natrium-Acetat-Puffer 0,2 M verdünnt.

Urin - und Liquor-Proben: Hier ist eine Deproteinisierung in der Regel nicht notwendig. Die Proben werden lediglich 1:30 mit Na-Ac-Puffer 0,2 M verdünnt, nachdem feste Bestandteile durch Zentrifugation entfernt wurden.

Alle Pipettierschritte werden im Eisbad und, soweit möglich, lichtgeschützt ausgeführt.

Für den Ansatz werden 150 µl der vorbehandelten Probe in ein Eppendorfgeläß pipettiert.

Dazu kommen 50 µl der Tyrosin-Apodecarboxylase-Suspension (0,5 mg/ml).

Nach gründlichem Mischen wird 20 Minuten lang bei 35°C vorinkubiert.

Die Proben werden danach wieder ins Eisbad gestellt.

Anschließend werden zum Starten der Reaktion 100 µl der ³H-Tyrosin-Lösung einpipettiert und die Ansätze nach dem Mischen 15 Minuten lang bei 35°C inkubiert.

Die Reaktion wird durch Einbringen der Reaktionsgefäße in einen Eppendorf-Thermoblock (95°C ; 4 Minuten) gestoppt.

Nach der Abkühlung im Eisbad wird hitzedenaturiertes Protein abzentrifugiert und 50 µl des Überstandes zum Trennlauf auf DEAE-Cellulose-Säulen aufgetragen.

Die Standardgerade wird mit Hilfe von PLP-Lösungen erstellt, die genauso wie die Proben behandelt werden.

Als Stammlösung wird eine Lösung von 30 mg PLP in 1 L Aqua bidest verwendet. Der Gehalt dieser Lösung kann spektrophotometrisch überprüft werden. Dazu wird 1 ml der Stammlösung mit 2 ml H₂O und 3 ml 0,2 M NaOH gemischt und deren Extinktion gegen 0,1 M NaOH gemessen (388 nm , Extinktionskoeffizient 6550) (90, 117).

5. ZUVERLÄSSIGKEIT DER METHODE

5.1 Eigenschaften der Tyrosindecaboxylase

5.1.1 Stabilität

Apoenzympräparationen sind häufig instabiler als die entsprechenden Holoenzyme, was sich z.B. bei der PLP-abhängigen Glutamatdecarboxylase stark bemerkbar macht (175).

Im Fall der Tyrosinapodecarboxylase wird der Aspekt der Stabilität allgemein als unkritisch betrachtet. Haskell und Snell (75) heben die besondere Stabilität dieses Enzyms hervor. Sundaresan und Cour-sin konnten innerhalb eines Zeitraums von einem Jahr kein Absinken der Aktivität einer bei minus 20 °C in 0,1 M Na Ac-Puffer aufbewahr-ten Tyrosindecaboxylaselösung feststellen. Auch andere Autoren be-richteten von mindestens monatelanger Stabilität der Enzymaktivität. Bei unseren Untersuchungen wurde die Tyrosinapodecarboxylase in 0,1 M Na Ac-Puffer (pH 5,5) in einem Substanzgehalt von 0,5 mg/ml bei ca. minus 20 °C aufbewahrt. Innerhalb eines Zeitraums von 6 Monaten konnte kein Absinken der Aktivität festgestellt werden.

5.1.2 Aktivität

Die im Handel befindlichen Tyrosinapodecarboxylasenpräparate bestehen aus gefrier- oder acetongetrockneten *Streptococcus faecalis*-Zellen, die auf pyridoxinfreiem Medium gezogen wurden.

Viele Autoren unterzogen diese Präparate weiteren Reinigungsschritten, um doch noch vorhandenes PLP zu entfernen und eine höhere Aktivitäts-ausbeute zu erzielen (20, 72, 90, 159).

Grundgedanke ist dabei, daß das Enzymprotein so vollständig wie mög-lich aus den getrockneten Bakterienzellen freigesetzt werden muß, was durch Homogenisierung und Ultraschallbehandlung von suspendierten Bakterienzellen erreicht wird. Anschließend fraktionierte Ammonium-sulfatfällungen erhöhen die katalytische Aktivitätskonzentration der schließlich verwendeten Enzymlösung und beseitigen weitgehend den Rest-PLP-Gehalt des Enzyms. Ob diese Reinigungsschritte notwendig sind, hängt von der Qualität der kommerziell vertriebenen Enzympräpa-rate und der Sensitivität der verwendeten Meßmethode ab.

Qualität des Enzympräparats bedeutet in diesem Fall, inwieweit das Enzymprotein in der Trockensubstanz frei vorliegt oder in Bakterienzellen eingeschlossen ist. In dieser Beziehung scheint es große Unterschiede zu geben. Offensichtlich ist hierbei die Art der Präparation von Bedeutung. Es wird angenommen, daß acetongetrocknete Zellen keine selektive Permeabilität mehr besitzen und PLP deswegen volle Aktivität entfalten kann. Bei gefriergetrockneten Zellen scheint dies nicht der Fall zu sein. Dies zeigt sich z.B. durch unterschiedliche Angaben in der Literatur bezüglich der notwendigen Vorinkubationszeit zur Bildung des Komplexes zwischen Apoenzym und PLP. Einerseits wird die Notwendigkeit einer mindestens halbstündigen Vorinkubationszeit nachgewiesen (72), andererseits eine Vorinkubation als unnötig angesehen (20). Dies läßt sich vielleicht dadurch erklären, daß in ersterem Fall im Enzympräparat die Bakterienzellen noch relativ unzerstört vorlagen, in letzterem eine weitergehende Permeabilität der Zellen oder Freisetzung des Enzymproteins erreicht wurde.

In einigen neueren Arbeiten wurde die Ammoniumsulfatfällung zur Reinigung des Apoenzyms weggelassen. Leinert et al. (90) behandelten ein käufliches Apoenzympräparat nur mit Ultraschall, um eine bessere Zerkleinerung der in der Trockensubstanz enthaltenen Zellbruchstücke zu erhalten (141). Diese Autoren hatten gefunden, daß der originäre PLP-Gehalt des Enzyms zu groß und seine spezifische Aktivität zu niedrig sei.

Diese beiden Faktoren werden offensichtlich eher bei den Methoden, die ^{14}C -markiertes Tyrosin als Substrat verwenden, zum Problem, da dessen spezifische Radioaktivität geringer ist als die des tritiierten Tyrosins und damit auch die Sensitivität dieser Tests. Leinert et al. erhielten beispielsweise eine Zählrate von ca. 330 CpM pro ng PLP. Bei unserem Essay mit ^3H -Tyrosin beträgt die Sensitivität jedoch ca. 40.000 CpM pro ng PLP. Außerdem wird nur 1/6 der bei Leinert et al. angegebenen Enzymaktivität pro Ansatz verwendet. Damit gelangen auch kleinere Mengen von PLP, die dem Enzym anhaften, in das Reaktionsmedium.

Es zeigte sich, daß ein Vorreinigungsschritt des Enzyms bei der in dieser Arbeit benutzten Methode unnötig war. Homogenisierung und

Ultraschallbehandlung der Enzymsuspension konnte weder die Leerwerte senken noch eine höhere Enzymaktivität erzielen gegenüber einer wie folgt aufbereiteten Enzymsuspension:

Die Trockensubstanz wurde in 0,1 M Na Ac-Puffer, pH 5,5 gegeben und im Eisbad mit Magnetrührer mindestens 6-8 Stunden lang gerührt. Bei dem Gehalt der Stammlösung von 0,5 mg Enzym/ml konnten nach dieser Zeit mit bloßem Auge keine partikulären Bestandteile mehr in der Suspension festgestellt werden. Sie machte einen homogenen, opaken Eindruck, war vom Aspekt her auch nicht von einer sonifizierten Suspension zu unterscheiden. Aliquote von ca. 1 ml wurden bei - 20 °C aufbewahrt.

Bhagavan et al. berichteten, daß abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile dieser Enzymsuspension in verringerter Aktivität resultierte (20). Dies wurde daher vermieden. Die Enzymsuspension wurde jeweils unmittelbar vor ihrer Verwendung sehr gründlich geschüttelt. Hiermit waren zufriedenstellende Duplikate zu erzielen.

Reinken erachtete ebenfalls eine Vorreinigung des Enzyms für unnötig (119). Diese Aussage bezog sich auf das auch in dieser Arbeit verwendete Präparat von SIGMA Chemical Co. .

5.1.3 Spezifität

Bei der hier verwendeten Methode war folgendes von Interesse:

- a) Aktivierung des Enzyms von anderen Vitamin B-6-Metaboliten außer PLP
- b) Verunreinigung des Enzympräparats durch Aktivitäten, die andere B-6-Metaboliten in PLP umwandeln können (z.B. PL-Kinase)
- c) Konkurrenz von anderen B-6-Metaboliten mit PLP am Enzym.

Zur Beantwortung der ersten Frage wurde Tyrosinapodecarboxylase (12 mU) mit verschiedenen B-6-Metaboliten inkubiert, die in einer Konzentration von 1 ng/ml im Ansatz vorlagen. Die normale PLP-Konzentration im Ansatz beträgt ca. 0,1 ng/ml (Tabelle 7).

Zum Nachweis von Pyridoxalkinaseaktivität wurde TDC (12 mU) zusammen mit Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxamin (1 ng/ml) unter Anwesenheit von ATP und Zinkchlorid (jeweils 1 mM) inkubiert.

Eine etwaige Konkurrenz zwischen B-6-Metaboliten sollte gezeigt werden durch Vorinkubation von IDC (12 mU) mit verschiedenen B-6-Metaboliten (außer PLP) und anschließende Zugabe von PLP (0,2 ng/ml).
Tabelle 8.

Spezifität der Tyrosinapodecarboxylase für PLP

Vitamin B-6- Metabolit im Assay	Relative Zählrate in %
-- (Na-Ac-Puffer 0,1 M)	0
Pyridoxalphosphat	100
Pyridoxamin	2
Pyridoxin	0
Pyridoxal	0
Pyridoxaminphosphat	0

Test auf Pyridoxalkinase - Fremdaktivität

Bestandteile im Assay	Relative Zählrate in %
Pyridoxal + ATP + Zn^{2+}	0
Pyridoxin + ATP + Zn^{2+}	2
Pyridoxamin + ATP + Zn^{2+}	0

Konkurrenz zwischen Vitamin B-6-Metaboliten

Vorinkubation mit	Relative Zählrate in %
---	+ PLP 100
Pyridoxamin	+ PLP 98
Pyridoxin	+ PLP 101
Pyridoxal	+ PLP 99
Pyridoxamin- PO_4	+ PLP 98
Pyridoxin- PO_4	+ PLP 94

Diese Ergebnisse zeigen, daß im Enzympräparat keine Fremdaktivität in Form von Pyridoxalkinase vorhanden ist und die Tyrosinapodecarboxylase durch keine Vitamin B-6-Metaboliten außer PLP aktiviert werden kann. Offensichtlich konkurrieren auch die anderen B-6-Derivate nicht mit PLP um die Bindungsstelle am Enzym.

Ähnliche Ergebnisse fanden Lumeng et al. (98) bei einem nachgereinigten Enzympräparat. Bisher war jedoch noch kein "Rohpräparat" auf diese Weise untersucht worden. Insoweit ist also die Erfassung von PLP unter Ausschluß der anderen B-6-Metaboliten bei dieser Methode gegeben.

5.2 Präzision der Methode

Präzision von Messung zu Messung

Es wurde die PLP-Konzentration in 18 Aliquoten der gleichen Plasma-
probe in 9 aufeinanderfolgenden Messreihen bestimmt. Jeweils wurden
2 Aliquote verwendet und der Mittelwert gebildet. Der Variations-
koeffizient wurde dann aus diesen 9 Mittelwerten berechnet.

Ergebnisse :

Bereich : 8,1 - 11,7 ng/ml

$\bar{x} \pm s$: 10,0 $\pm$ 1,0 ng/ml

$$V = \frac{s}{\bar{x}} = 0,11 ;$$

$$V_r = \frac{\frac{s}{\bar{x}}}{n} 100 = 3,51 \% ;$$

Präzision innerhalb einer Messreihe

Hierzu wurden 5 Aliquote von einer Plasmaprobe gemessen.

Ergebnisse :

Bereich : 12,1 - 15,0 ng/ml

$\bar{x} \pm s$: 13,5 $\pm$ 1,1 ng/ml

$$V = \frac{s}{\bar{x}} = 0,08$$

$$V_r = \frac{\frac{s}{\bar{x}}}{n} = 3,64 \% ;$$

5.3 Vergleichswerte in der Literatur für den Plasma-PLP-Gehalt

Als ein Kriterium der Qualitätskontrolle dienen Vergleiche mit Angaben in der Literatur. Als Anhaltspunkt wurden von acht Erwachsenen Plasmaproben aus venösen Blutentnahmen untersucht. Es wurde ein mittlerer PLP-Gehalt von $10,0 \pm 1,5$ ng/ml festgestellt. Ein etwas höherer Wert von 22,4 ng/ml bei einer Person konnte auf die Einnahme eines Multivitaminpräparats zurückgeführt werden.

Tabelle 9 zeigt Vergleichswerte von anderen Autoren, die ebenfalls mit der Tyrosinapodecarboxylasemethode gemessen wurden.

Tabelle 9 : PLP im Plasma

Autor	Altersgruppe	n	Plasma-PLP (ng/ml)
Wachstein (1960) et al. (166)	Erwachsene	40	$9,6 \pm 2,8$
Camp et al.(1983) (28)	25 - 40 J	12	$13,1 \pm 1,6$
Hamfelt et al. (1962) (72)	Erwachsene	12	$9,9 \pm 3,3$
Lumeng, Li; (1981) (98)	?	6	$18,5 \pm 4,8$
Lumeng, Li; (1974) (96)	Erwachsene	94	$12,3 \pm 0,3$
Bhagavan et al. (1975) (18)	2 - 19 J	9	13,9
Hamfelt et al. (1966) (70)	1 - 73 J	37	$11,7 \pm 2,5$
Spannuth et al. (1976) (149)	Erwachsene	9	$11,8 \pm 1,6$
Reinken (1972) (119)	1 - 13 J	26	$8,7 \pm 2,3$
Chabner, Living- ston (1970)(30)	Frauen, 20 - 34J	12	$16,8 \pm 3,6$
	Frauen, 35 - 49J	7	$11,4 \pm 3,4$
	Männer, 20 - 34J	17	$18,5 \pm 5,5$
	Männer, 35 - 49J	7	$15,8 \pm 3,3$

6. ANWENDUNG DER MESSMETHODE AUF BLUT- UND URINPROBEN

6.1 Deproteinisierung von Plasmaproben

PLP ist im Blutplasma an Albumin gebunden. Die Bindungskapazität von Albumin für das Coenzym beträgt ca. 800 µg PLP/g, sie ist beträchtlich höher als der tatsächliche Plasmagehalt von PLP (97). Das heißt, um zu einer quantitativen Bestimmung von PLP zu gelangen, wird es günstig sein, das Plasma zu deproteinisieren.

Wünschenswerte Bedingungen beim Enteiweißungsvorgang sind: Keine Störung der nachfolgenden Enzymreaktion, möglichst geringe Probenverdünnung, keine Änderung der Konzentration oder Struktur des zu bestimmenden Bestandteils, möglichst vollständige Extraktion, zeitsparende Handhabung und einfache Durchführung mit möglichst wenigen Pipettierschritten, um die Fehlerbreite möglichst gering zu halten. In der Literatur findet man die Verwendung von Säuren, insbesondere Trichloressigsäure (TCA) und Perchlorsäure (PCA) bevorzugt. Bei Verwendung von TCA kann der Säureüberschuß nach der Fällung der Proteine durch Ausschüttung mit wassergesättigtem Äther entfernt werden. Diese Methode ist jedoch vergleichsweise umständlich, insbesondere wenn große Zahlen von Proben behandelt werden sollen.

Perchlorsäure als Enteiweißungsmittel bietet den Vorzug, daß bei Neutralisieren des Überschusses an Anionen mit einer stöchiometrischen Menge an KOH das schwerlösliche Kaliumperchlorat ausfällt. Dies ist insbesondere bei der hier verwendeten Trennmethode mit Ionenaustauschercellulose günstig, da hierdurch die Ionenkonzentration im Reaktionsmedium gering gehalten und eine Überlastung des Adsorbens vermieden werden kann.

Der Einfluß verschiedener Säuren auf die Enzymreaktion war sehr ähnlich. Aus Abb.20 geht hervor, daß die Anwesenheit von NaCl im Reaktionsmedium die Steigung der Eichkurve gegenüber der, die in 0,1 M Na Ac-Puffer bestimmt wurde, etwas erhöhte (Geraden A und B). Die Behandlung von PLP-Stammlösungen mit Perchlorsäure und Rücktitration mit KOH verkleinerte die Steigung der Eichkurve (Gerade C).

Der Effekt war jedoch geringfügig, ebenso wie bei der Anwendung von Sulfosalicylsäure, TCA und Metaphosphorsäure. Eichkurven von PLP-Lösungen, die mit diesen Säuren behandelt wurden, waren gegenüber der Eichkurve mit Perchlorsäure lediglich parallelverschoben, aber nicht

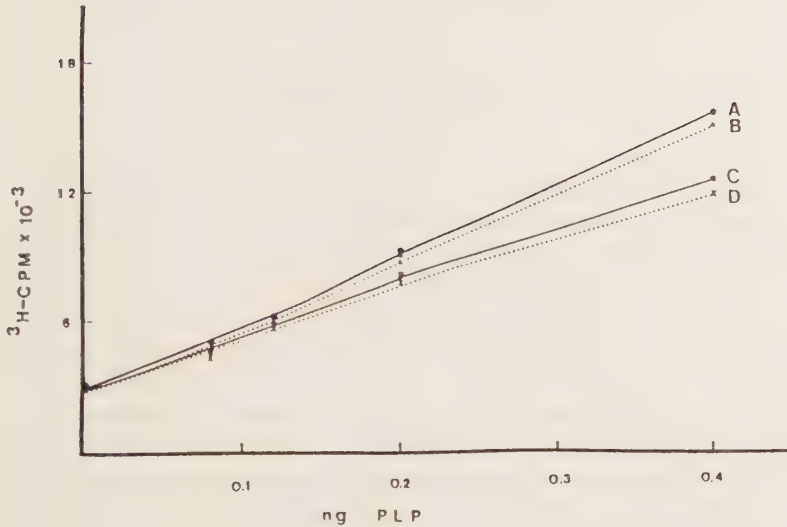


Abb. 20 : Einfluß von Perchlorsäure und NaCl auf die katalytische Aktivität.

A : 0,1 M Na-Ac-Puffer + 7,5 mM NaCl.

B : 0,1 M Na-Ac-Puffer.

C : 0,1 M Na-Ac-Puffer + 14 mM PCA (mit KOH auf pH 5,5 titriert) + 7,5 mM NaCl.

D : 0,1 M Na-Ac-Puffer + 14 mM PCA (mit KOH auf pH 5,5 titriert) .

abgeflacht, es trat also keine gravierendere Enzymhemmung als bei Anwesenheit von PCA auf.

Die Vollständigkeit der Extraktion wurde mit einer Plasmaprobe geprüft, die in mehrere Aliquote aufgeteilt und mit vier verschiedenen Säuren behandelt wurde. Die Titration auf pH 5,5 erfolgte mit KOH, dann wurde entsprechend dem vermuteten Plasmagehalt an PLP mit 0,2 M Na Ac-Puffer weiter verdünnt. Der pH betrug in allen Reaktionsmedien $5,5 \pm 0,05$.

Tabelle 10 zeigt, daß die Extraktion mit 50 %iger TCA am vollständigsten war, am geringsten mit 20 %iger Metaphosphorsäure. Sulfosalicylsäure, TCA (25 %) und PCA gaben ungefähr gleiche Extraktionsergebnisse.

Tabelle 10 : Deproteinisierung einer Plasmaprobe mit verschiedenen Säuren

Verwendete Säure	Gemessener Plasmagehalt
Perchlorsäure 23 %	10,1 ng/ml
Trichloressigsäure 50 %	11,4 ng/ml
Trichloressigsäure 25 %	10,1 ng/ml
Metaphosphorsäure 20 %	9,0 ng/ml
Sulfosalicylsäure 20 %	10,9 ng/ml

Wegen des oben erwähnten prinzipiellen Vorteils der Deproteinisierung mit PCA, der der speziellen Trennmethode Rechnung trägt, und der nur geringfügigen Unterschiede der Qualität der Extraktion wurde für den Routinebetrieb PCA (23 %) als Enteiweißungsmittel gewählt.

Behandlung von Blut- und Plasmaproben:

Vier Teile Probematerial wurden mit einem Teil PCA (23 %) versetzt. Grundliche Durchmischung wurde durch Verwendung eines Rührspatels erreicht, das ausgefallte Protein in der Tischzentrifuge 5 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit Kalilauge (10 %) auf einen

pH-Wert von ca. 2,5 - 3 gebracht, um keine Übertitration zu erhalten und die Probe mit zu vielen Kationen zu belasten. Die Einstellung des pH auf exakt 5,5 wurde durch Verdünnung der Probe in 0,2 M Na Ac-Puffer erreicht. Der Verdünnungsfaktor wurde entsprechend dem vermuteten PLP-Gehalt der Probe gewählt, bei Plasma also etwa 1:80.

6.2 Stabilität von PLP im Probenmaterial

Da es sich in der Praxis nicht umgehen läßt, Probenmaterial bis zur Analyse zu konservieren, wurde die Haltbarkeit von PLP in Vollblut und Plasma unter verschiedenen Lagerungsbedingungen geprüft. Die Lichtempfindlichkeit von PLP ist bekannt. Die Halbwertszeit von PLP in einer dem Tageslicht ausgesetzten Plasmaprobe wurde von uns auf etwa 12 Stunden geschätzt. Proben müssen also unbedingt vollständig lichtgeschützt aufbewahrt werden.

Ein weiteres Kriterium ist die Lagerungstemperatur. Vollblutproben zeigten, wenn sie bei ca. 4 °C aufbewahrt wurden eine gute Konstanz der Meßwerte über einen Zeitraum von 4 Tagen hinweg. Die in Abb.21 verwendeten Proben stammten von einer Blutabnahme, die zu einem Teil mit Heparin, mit EDTA und ohne Antikoagulans aufbewahrt wurde. Aus der guten Übereinstimmung der Meßwerte geht deshalb auch hervor, daß die Art des Antikoagulans weder auf die Haltbarkeit von PLP noch auf die Nachweisreaktion einen Einfluß ausübte.

Eine weitere Testreihe befaßte sich mit der Stabilität bei Raumtemperatur. Dies war auch im Hinblick auf die Möglichkeit des Postversands von Proben und die hierfür notwendigen Bedingungen von Interesse. Das Material, das für die Messungen der Abb.22 verwendet wurde, war eine heparinisierte Blutprobe, von der ein Teil als Vollblut in Aliquoten aufbewahrt wurde. Ein anderer Teil wurde zentrifugiert und als Plasma und gewaschene Erythrozyten aliquotiert.

Das Blutplasma zeigte einen annähernd linearen Abfall des PLP-Gehalts auf ca. 81 % des Ausgangswerts am 2. Tag und 59 % am 7. Tag.

Im Vollblut sank der PLP-Spiegel während der ersten 48 Stunden rascher ab als im Plasma, zeigte dann aber eine wiederaufsteigende Tendenz bis zum 7. Tag.

Ein erstaunliches Ergebnis bot der Verlauf der PLP-Konzentration in gewaschenen Erythrozyten. Hier fand sich eine Steigerung des PLP-Gehalts auf ca. 55 ng/ml nach 2 Tagen, von einem Ausgangswert von

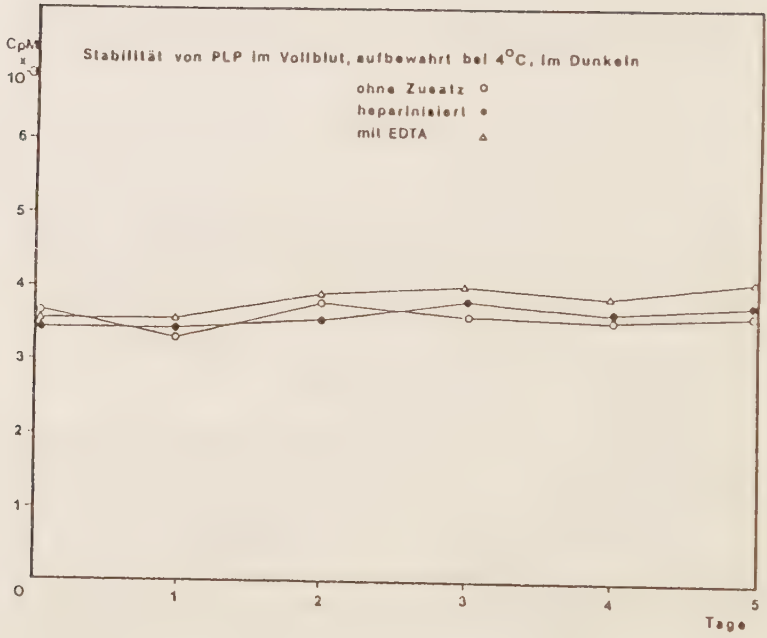


Abb. 21 : Haltbarkeit von PLP im Vollblut

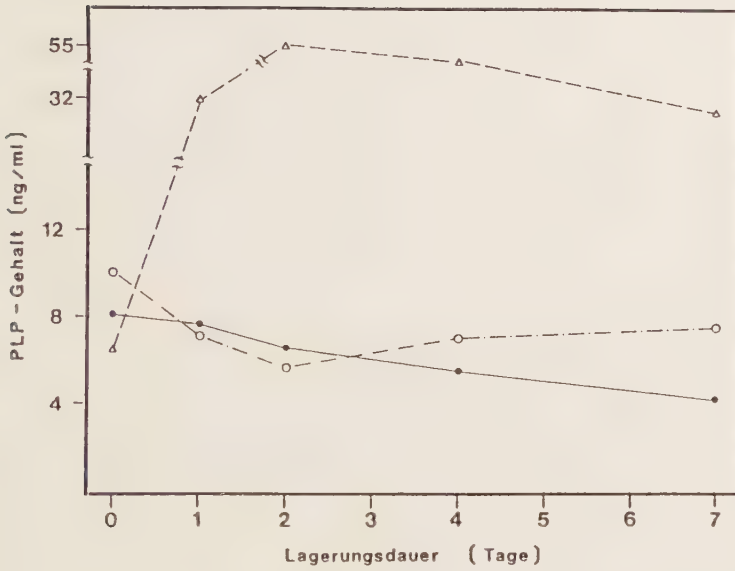


Abb. 22 : Stabilität von PLP in Probenmaterial bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß .

(●) : Blutplasma

(○) : Vollblut

(△) : Gewaschene Erythrocyten

6,5 ng/ml ausgehend.

Der Ursache für diesen enormen Anstieg der PLP-Konzentration konnte im Rahmen dieser Untersuchung nicht nachgegangen werden, es handelte sich jedoch offensichtlich nicht um einen Meßfehler innerhalb dieser einen Meßreihe, da in einer vollkommen gleich behandelten Kontrollserie der gleiche Effekt auftrat. Zur Überprüfung wurden außerdem gewaschene Erythrozyten aus einer Blutprobe im Kühlschrank und bei 22 °C aufbewahrt und nach gleichen Lagerungszeiten der PLP-Gehalt gemessen. Die Proben im Kühlschrank zeigten einen langsameren Anstieg von PLP in den Erythrozyten, der sich aber in ähnlicher Größenordnung bewegte wie bei den bei 22 °C aufbewahrten Proben.

Ein Zufallsbefund gab einen weiteren Hinweis auf diesen Effekt. Eine heparinisierte Vollblutprobe, die aus Versehen 5 Tage lang statt im Tiefkühlschrank nur bei 4 °C aufbewahrt worden war, wurde zentrifugiert und der PLP-Gehalt in Erythrozyten und Plasma bestimmt. Es fanden sich 298 ng/ml in den Erythrozyten und 6 ng/ml im Plasma.

Außerdem zeigten Vollblutproben, die das Labor über Postversand erreichten, in einigen Fällen sehr viel höhere PLP-Konzentrationen in Erythrozyten als im Plasma, obwohl normalerweise diese Verteilung etwa 1:1 ist (18).

Vor dem Hintergrund der vollständigen Ausstattung der Erythrozyten mit den Enzymen des Vitamin B-6-Metabolismus betrachtet, stellten diese Beobachtungen ein komplexes Problem dar. Es ist bekannt, daß Erythrozyten relativ schnell PLP synthetisieren und in hohen Konzentrationen speichern können. Gabe pharmakologischer Dosen von Vitamin B-6 resultierte in Akkumulation von bis zu 21 µg PLP/g Erythrozyten. Das ist mehr, als sich in Leberzellen befindet (99). Bhagavan et al. fanden bei Kindern, die mit 13 mg Pyridoxin pro Kilogramm Körpergewicht behandelt wurden, einen Anstieg des Erythrozyten/Plasma-Quotienten von PLP auf bis zu 50 (18).

Anderson et al. zeigten, daß die Verteilung von Pyridoxal zwischen Erythrozyten und Plasma auf einem Verhältnis von etwa 2:1 konstant bleibt. Sie konnten nachweisen, daß die Aufnahme von Pyridoxal in Erythrocyten direkt proportional ist zu deren Volumen in einer Blutprobe, wenn das Plasmavolumen konstant gehalten wird. Alle Formen von Vitamin B6 werden in den Erythrocyten via PLP zu Pyridoxal umgewandelt, von dem ein Teil ins Plasma freigesetzt wird (4). Die Effektivität dieser Reaktionen in den Erythrocyten wird durch die oben erwähnten Befunde von Bhagavan et al. und Lumeng et al. verdeutlicht.

Im Hinblick auf die Veränderungen der Konzentrationen von B6-Metaboliten in gelagertem Vollblut konnten Anderson et al. zeigen, daß PLP in Erythrocyten normal gebildet wurde, jedoch die Umwandlung von PLP zu Pyridoxal gehemmt wurde. Sie vermuteten, daß die im Laufe der Lagerungsdauer beim Zerfall organischer Phosphatverbindungen sich ansammelnden anorganischen Phosphate die PLP-katabolisierenden Phosphatasen hemmen könnten und damit der intrazelluläre Anstieg der PLP-Konzentration zu erklären sei (4).

In der Praxis wurde aufgrund dieser Beobachtungen darauf geachtet, daß bei Blutproben möglichst schnell Plasma und Erythrocyten getrennt wurden. Es empfiehlt sich außerdem, für den Versand von Blutproben Plasma und nicht Vollblut oder gewaschene Erythrocyten zu verwenden.

6.3 Wiederfindungsversuche

Wiederfindungsversuche bei der Verarbeitung von Plasmaproben dienen hauptsächlich als Test für die Zuverlässigkeit des wichtigsten Aufbereitungsschritts, der Deproteinisierung. Wie schon in 6.1 angedeutet, dient dieser Schritt hauptsächlich dazu, den zu bestimmenden Bestandteil einer Probe aus einer Proteinbindung zu befreien, die ihn daran hindert, an der enzymatischen Nachweisreaktion teilzunehmen. Außerdem werden durch die Ansäuerung der Probe auch Substanzen ausgefällt, die die Nachweisreaktion hemmen könnten.

Nicht in allen Fällen enzymatischer Nachweisreaktionen ist eine Deproteinisierung unabdingbare Notwendigkeit, auch nicht bei der Bestimmung von PLP. Masugi et al. (104) konnten zeigen, daß eine Aktivierung von Apoaminotransferasen durch albumingebundenes PLP möglich war. Das aktive Enzym lag dann als Apoenzym-PLP-Albumin-Komplex vor.

Auch für den Nachweis von PLP mit Hilfe der Tyrosinapodecarboxylase wurde die Notwendigkeit der Deproteinisierung in Frage gestellt. Camp et al. (28) stellten fest, daß sie bei der Verarbeitung von Plasmaproben nicht erforderlich sei. Bei dem empfindlichen Assay, das ^3H -Tyrosin als Substrat verwendete, fanden sie identische Ergebnisse bei nicht deproteinisiertem und TCA-behandeltem Plasma.

Eine Überprüfung, ob die Deproteinisierung notwendige Voraussetzung für den Testansatz ist, wird also vorteilhaft sein, zumal Unsicherheit bezüglich der Wirkung der Säurepräzipitation auf das Meßergebnis bei vielen Arbeiten über die enzymatische PLP-Bestimmung geäußert wurde (142).

Storvick und Peters beurteilten diesen Schritt als die wahrscheinliche Hauptursache für Schwierigkeiten bei der Analyse von PLP in Blutproben, wie z.B. unbefriedigende Präzision oder ungenügende Wiederfindungsraten (158).

Die Frage, ob eine Deproteinisierung von Plasmaproben die Reaktionsrate steigert, wurde beantwortet, indem Aliquote von 10 Plasmaproben vor Einsetzen in die Analyse wie unter 6.1 beschrieben deproteinisiert wurden. 10 weitere Teilmengen der gleichen Plasmaproben wurden lediglich entsprechend dem bei der Enteiweißung erhaltenen Verdünnungsfaktor mit 0,9 % NaCl verdünnt, ansonsten genau gleich behandelt. Die Ergebnisse des Versuchs zeigt Tabelle 11.

Tabelle 11 : Einfluß der Säurepräzipitation von Proteinen mit Perchlorsäure auf die PLP-Konzentration von Plasmaproben

n	PLP (ng/ml)		Quotient	mit PCA ohne PCA
	mit PCA	ohne PCA		
15	8,2 ± 3,8 (3,8 - 15,8)	5,0 ± 2,8 (0,2 - 10,6)		1,6

Die um etwa 60 % höhere PLP-Konzentration in enteiweißten Proben zeigte, daß die Deproteinisierung von Plasmaproben bei dem hier verwendeten Ansatz nicht zu umgehen war. Anders war dies bei Liquor- und Urinproben. Hier erwies sich die Säurepräzipitation als unnötig.

Die Frage der quantitativen Erfassung wurde durch Wiederfindungsversuche behandelt. Hierzu wurde Plasmaproben eine definierte Menge PLP zugegeben. Zu den gleichzeitig bestimmten originären PLP-Konzentrationen der Proben wurde die zugegebene PLP-Konzentration addiert und die tatsächlich gemessene Konzentration mit diesem theoretischen Wert verglichen. Die Konzentration nach Zugabe von PLP war rechnerisch 20 ng/ml, wurde jedoch im Versuch in einer Probe mit physiologischer NaCl-Lösung zu 19,2 ng/ml bestimmt. Tabelle 12 zeigt die so erhaltenen Werte bei 6 Plasmaproben.

Tabelle 12 : Wiederfindungsraten bei Plasmaproben

Ausgangskonzentration ng/ml	Addierte Konzentration ng/ml	Gemessene Konzentration ng/ml	Wiederfindung %
0,4	19,2	16,4	84
8,1	19,2	26,7	98
4,4	19,2	25,2	107
6,5	19,2	27,8	105
3,0	19,2	26,0	113
3,2	19,2	18,8	84

Eine andere Art von Wiederfindungsversuchen resultierte in unbefriedigenden Ergebnissen. Hierbei wurden Plasmaproben solange dem Tageslicht ausgesetzt, bis der PLP-Gehalt auf 0 abgesunken war. Dann wurde diesen Proben eine bekannte Menge PLP zugesetzt und nach einer kurzen Inkubationszeit (leichtes Schütteln unter Lichtabschluß) die Analyse durchgeführt. Die Wiederfindungsraten bei diesen Versuchen lagen um ca. 70 - 80 %. Die hier anklingende Frage, ob die Extraktion von PLP durch Säurebehandlung vollständig ist, wurde z.B. von Schrijver et al. (131) mit Hilfe von tritiiertem H_2O behandelt. Wurde die Säurepräzipitation der Proteine einer Probe, die tritiiertes H_2O enthielt, durchgeführt, so fanden sich ca. 11,3 % des 3H_2O im Präzipitat. Dies wurde als der Anteil der wässrigen Bestandteile einer Probe betrachtet, der unvermeidlich im Pelletvolumen eingeschlossen bleibt. Der Anteil der PLP-Gesamtmenge in der Probe, der sich im Präzipitat fand, betrug jedoch 23,4 %, also rund 12 % mehr als sich durch bloßen Flüssigkeitseinschluß in das Präzipitat erklären ließe.

Ähnliche Ergebnisse erhielten Lumeng et al., ebenfalls mit TCA-Extraktion. Sie fanden 23 % der Gesamtaktivität tritiierten Wassers im Pellet und ca. 30 % des PLP-Gehalts, also etwa 7 % mehr PLP als erwartet (98).

Der Frage der Qualität der Säureextraktion von PLP wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der Ultraschallbehandlung von Proben nachgegangen.

Hierzu wurden Lösungen von Humanalbumin herangezogen.

Zu einer Lösung von 0,07 g Albumin pro ml 0,9 % NaCl wurde eine definierte Menge PLP gegeben und etwa 60 Minuten lang unter leichtem Schütteln und Lichtabschluß inkubiert. Danach wurden Aliquote dieser Lösung folgendermaßen behandelt:

- a) Vier Teile Albuminlösung wurden mit einem Teil PCA 23 % deproteinisiert, das Pellet abzentrifugiert und der PLP-Gehalt im Überstand bestimmt.
- b) Albuminlösung wurde wie unter a) deproteinisiert, dann jedoch das ausgefällte Protein mit dem Überstand durch Rütteln vermischt und dieses Gemisch mit dem Ultraschallgerät (Mikrotip, 1/2 maximale Leistung), in Intervallen von ca. 5 Sekunden insgesamt 30 Sekunden lang im Eisbad beschallt. Hiernach wurde das gefällte Protein abzentrifugiert.
- c) Zusätzlich wurde für a) und b) jeweils der PLP-Gehalt des Pellets nach Extraktion mit PCA 2,3 % bestimmt.
- d) Der PLP-Gehalt der Lösung wurde ohne Deproteinisierung bestimmt.

- e) Albuminlösungen wurden wie unter a) behandelt, dann jedoch das Pellet einmal in 2,3 % PCA gewaschen und die beiden Überstände vereinigt. Hierin wurde dann der PLP-Gehalt bestimmt.

Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse (jeweils Duplikate).

Behandlung der Albuminlösung	Ausgangskonzentration PLP 30 ng/ml	
	Gemessene Konzentration	Wiederfindung
a)Deproteinisierung mit PCA	27,6 ng/ml	92 %
b)Deproteinisierung mit PCA u. Ultraschallbehandlung des Pellets	32,8 ng/ml	109 %
d)Ohne Deproteinisierung	28,3 ng/ml	94 %
c)Pellet von a)	65,2 ng/ml	
Pellet von b)	18,5 ng/ml	
e)Deproteinisierung mit PCA und Waschen des Pellets	30,6 ng/ml	102 %

Es geht hieraus hervor, daß nach Ultraschallbehandlung einer deproteinierten Probe bessere Extraktion von PLP auftritt. Die Wiederfindungsrate nach normaler Deproteinisierung beträgt 92 %, mit zusätzlicher Beschallung 109 %. Erstaunlicherweise betrug die Recovery ohne Deproteinisierung 94 %, sie war also etwas höher als bei normal enteiweißten Proben. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß ein Teil des in der Probe enthaltenen PLP nach der Deproteinisierung an das ausgefällte Protein gebunden bleibt bzw. neu gebunden wird. Noch deutlicher wird dies beim Vergleich der PLP-Konzentrationen in den jeweiligen Pellets. Im Pellet von a) ist PLP im Vergleich zur Ausgangskonzentration sogar angereichert, was den oben angeführten Befund in der Literatur entspricht und darauf hinweist, daß tatsächlich mehr PLP an ausgefälltes als an gelöstes Albumin gebunden ist. Nach Ultraschallbehandlung des

präzipitierten Albumins ist dessen PLP-Gehalt gegenüber der Ausgangskonzentration vermindert, was die bessere Extraktion nach Beschallung bestätigt. (Es wäre hier aufschlußreicher, statt der Konzentrationen absolute Zahlen, also PLP-Mengen, anzugeben, was aber wegen des sehr geringen Pelletvolumens nicht durchführbar war).

Als Ursache für die Bindung von PLP an ausgefälltes Protein wird angenommen, daß PLP zwar aus der spezifischen Bindung an Lysinreste des Albumins freigesetzt wird (46), jedoch wegen der Reaktionsfreudigkeit seiner Aldehydgruppe durch Schiff-Basen-Bildung mit anderen, durch die Zerstörung der Protein-Konfiguration freiwerdende Aminosäurenreste wieder gebunden wird (144).

In der Praxis zeigte sich, daß die routinemäßig neben Meßreihen mitgeführten Wiederfindungsversuche befriedigende Ergebnisse zeigten, wenn Proben verwendet wurden, die vorher im Tiefkühlschrank gelagert worden waren. Da dies bei praktisch allen Patientenproben der Fall war, wurden diese ohne Ultraschallbehandlung oder Waschen des Pellets verarbeitet.

Bei Plasmaproben, die nicht eingefroren waren, fanden sich in der Regel schlechtere Wiederfindungsraten.

6.4 Messungen des PLP-Gehalts im Vollblut und Urin bei 5 Altersgruppen

6.4.1 Material

Die Blutproben wurden durch Venenpunktion erhalten. Sie wurden jeweils aufgeteilt in ein Aliquot, das als Vollblut bei -20°C aufbewahrt und dann verarbeitet wurde und einen Anteil, der sofort zentrifugiert wurde. Das Plasma wurde mit Sulfosalicylsäure deproteinisiert und dann eingefroren. Es zeigte sich allerdings, daß PLP in dem sauren Überstand sehr instabil war. Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten, wurden deshalb nur die Vollblutproben ausgewertet. Angaben zum Plasmagehalt verschiedener Altersgruppen finden sich in Kapitel 7.5.4.

Der Uringehalt wurde aus dem 24-Stunden-Urin bestimmt.

Das Probenmaterial wurde von Fräulein Brigitta Friedrich gesammelt und vorbereitet. Vergleiche zwischen dem Blut-PLP-Gehalt und der Cystathionin-Ausscheidung bei Patienten mit biliärer Atresie und Neuroblastom wurden im Rahmen von Untersuchungen angestellt, die sich mit den Zusammenhängen zwischen dem Vitamin B 6-Stoffwechsel und der bei diesen Erkrankungen auftretenden sekundären Cystathioninurie befassen (Endres et al. (54, 55), Shin et al. (137)).

6.4.2. Ergebnisse

Die Tabellen 14 und 15 geben die Normalwerte im Vollblut und Urin bei 5 verschiedenen Altersgruppen an. Man kann aus den Tabellen die Tendenz zu sinkenden PLP-Spiegeln bei steigendem Lebensalter erkennen, jedoch sind die Mittelwerte der einzelnen Altersgruppen im Vollblut in keinem Fall statistisch signifikant vom Mittelwert der nächst höheren Altersgruppe verschieden (95 % Niveau), was durch die hohe Streubreite der Werte innerhalb der Gruppen bedingt ist.

Die Mittelwerte des Urin-PLP-Gehalts unterschieden sich jedoch signifikant zwischen der Gruppe der Säuglinge von 2 bis 13 Monaten Alter und derjenigen der Kinder und Jugendlichen, sowie zwischen der Kinder- und der Erwachsenengruppe.

Abbildung 23 zeigt, was aus dem Vergleich der Tabellen vermutet werden kann, nämlich eine gute Korrelation zwischen dem Vollblut- und Urin-PLP-Werten. ($r = 0,77$).

Tabelle 14 : PLP-Konzentrationen im Vollblut von gesunden Säuglingen, Kindern und Erwachsenen

Alter	n	PLP (ng/ml)	
		$\bar{x} \pm s$	Bereich
3 Tage	3	22,2 $\pm$ 16,5	8,5 - 40,5
10 Tage	5	26,6 $\pm$ 21,4	4,9 - 58,3
20-50 Tage	13	28,1 $\pm$ 22,2	5,9 - 70,8
1 - 10 Jahre	11	15,1 $\pm$ 12,8	4,7 - 35,2
10 - 40 Jahre	9	7,0 $\pm$ 4,0	3,4 - 15,2

Tabelle 15 : PLP-Konzentrationen im Urin von gesunden Säuglingen, Kindern und Erwachsenen

Alter	n	PLP (ng/ml)	
		$\bar{x} \pm s$	Bereich
3 Tage	20	1,65 $\pm$ 2,35	0 - 8,0
10 Tage	20	3,34 $\pm$ 3,91	0,1 - 16,2
10-50 Tage	11	4,32 $\pm$ 4,39	0,6 - 14,5
2 - 13 Monate	7	3,48 $\pm$ 2,88	0 - 9,3
3 - 15 Jahre	23	0,95 $\pm$ 0,84	0 - 3,1
23 - 40 Jahre	8	0,24 $\pm$ 0,16	0 - 0,5

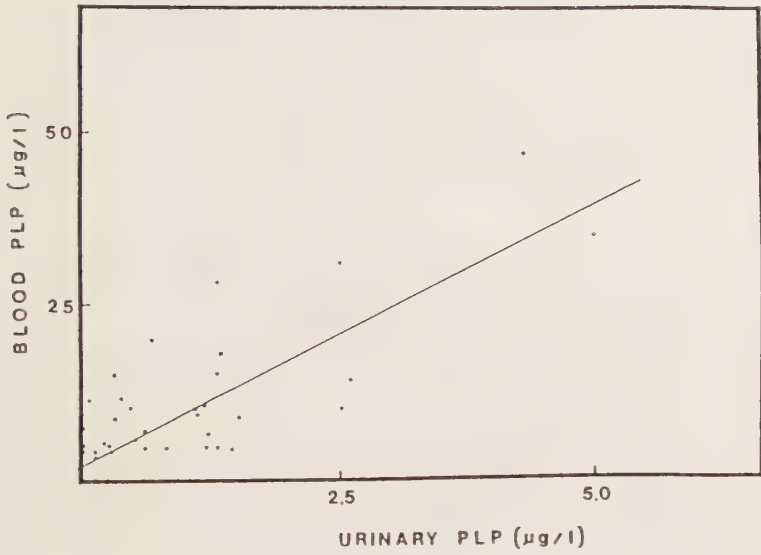


Abb. 23 : Korrelation zwischen Blut- und Urin-PLP-Konzentration bei verschiedenen Altersgruppen.
n = 35 ;

6.4.3. Erläuterungen

Die fragliche Altersabhängigkeit des Blut-PLP-Gehalts steht in der Literatur noch in der Diskussion. Leklem konnte bei seinen Untersuchungen ebenfalls ein leichtes aber nicht signifikantes Absinken des PLP-Spiegels mit dem Alter feststellen (140), Hamfelt et al. dagegen fanden eine signifikante Altersabhängigkeit (71). Leklem schlug deshalb vor, Studien zum Alterseffekt unter kontrollierter Vitamin B 6-Aufnahme durchzuführen.

Allgemein werden Messungen des PLP-Gehalts im Vollblut oder Blutplasma als aussagekräftiger Indikator des Versorgungszustandes des Organismus mit PLP bewertet. Hierfür gibt es verschiedene Gründe:

Der Plasma-PLP-Wert ist z.B. auch ein Indikator für die Intaktheit des Vitamin B 6-Metabolismus in Leber und Blut, da das im Plasma vorhandene PLP praktisch ausschließlich in der Leber produziert wird (99). Beispielsweise sinkt der Plasma-PLP-Gehalt bei chronischem Alkoholismus vermutlich wegen beschleunigten Abbaus im Blut ab (96). Bei verschiedenen Lebererkrankungen ist die Syntheserate von PLP aus oral appliziertem Pyridoxin in der Leber verringert und damit zugleich der Plasma-PLP-Gehalt (96,123).

Plasma-PLP korreliert sehr gut mit den mengenmäßig wichtigsten Reserven im Skelettmuskel (95). Es konnte außerdem gezeigt werden, daß bei Ratten der PLP-Gehalt im Gehirn und in der Leber bei Einnahme von 12 µg Vitamin B 6 pro Tag ein Maximum erreichte, die Aufnahmefähigkeit in Plasma und Muskel jedoch auch bei 100 µg pro Tag noch nicht gesättigt war. Dies weist, zusammen mit dem in Isotopenstudien bewiesenen direkten Zusammenhang zwischen dem Muskel- und Plasma-PLP-Gehalt, auf eine Speicherfunktion des Plasma-PLP hin (92).

Die Veränderungen der PLP-Konzentration im Gehirn, Leber, Muskel und Blutserum bei einerseits vollständiger Vitamin B 6-Restriktion und andererseits überoptimaler Einnahme in länger dauernden Versuchen an Ratten waren am geringsten im Gehirn, am höchsten in Muskel und Serum. Im Serum differierten die PLP-Spiegel zwischen der Gruppe mit Vitaminmangel und derjenigen mit überoptimaler Einnahme um fast 100 %, im Gehirn war der Unterschied nur 30 % (95).

Serum-PLP ist also der am leichtesten mobilisierbare PLP-Speicher neben dem Muskelgehalt. Sieht man dies zusammen mit dem Befund, daß die Konzentrationen der beiden Reservoirs positiv miteinander korrelieren und der Tatsache, daß Serum-Vitamin B 6 nur ca. 1 % des Gesamtgehalts im Körper beträgt, wird klar, daß der Plasma-PLP-Gehalt auch ein sensibler Indikator für Veränderungen des Bedarfs der Körperreservoirs sein wird (85,95,136).

Das heißt, daß sowohl nutritive als auch metabolische Einflüsse den Plasmaspiegel von PLP bestimmen.

Der nutritive Einfluß wurde von Shultz und Leklem bewiesen, die strenge Korrelationen fanden zwischen

- a) Vitamin B 6-Aufnahme und Plasma-PLP-Gehalt.
- b) Vitamin B 6-Aufnahme und Urin Vitamin B 6-Gehalt.
- c) Urin-Vitamin B 6-Gehalt und Plasma-PLP-Gehalt (140).

Die Fluktuationen des PLP-Spiegels im Plasma sind bei normaler Ernährung recht gering. Der individuelle PLP-Spiegel bleibt über Monate ziemlich konstant, ist durch den Menstruationszyklus nicht beeinflussbar, während die Spiegel der anderen im Plasma vorhandenen Metabolite stärker schwanken (136). PLP ist außerdem die mengenmäßig im Plasma vorherrschende Form mit ca. 60 % des Gesamtgehalts (99).

Änderungen in der Nahrungsaufnahme von Vitamin B 6 sind prompt von gleichsinnigen Änderungen der Plasma-PLP-Konzentration gefolgt, bei länger dauernder Erhöhung oder Senkung der Einnahme stellt sich eine neue Gleichgewichtskonzentration ein. Lumeng et al. fanden, daß bei oraler Einnahme von Pyridoxin 100 mg/die nach einer Woche ein steady-state-Wert des Plasma-PLP erreicht war (99).

Da PLP die kokatalytisch aktive Form von Vitamin B 6 ist, empfiehlt sich ebenfalls deren Bestimmung anstatt derjenigen des Gesamt-Vitamin B 6. Beispielsweise könnte eine unzureichende Bildung von PLP bei der Messung des Gesamtvitamingehalts nicht erkennbar sein.

7. MESSUNG VON PYRIDOXALPHOSPHAT IM LIQUOR CEREBROSPINALIS

7.1. Einleitung: Bedeutung von Vitamin B6 für das Zentralnervensystem.

7.1.1. Vitamin B6-Mangel

Störungen der Funktion des Zentralnervensystems waren neben typischen Hauterscheinungen und Anämien im Tierversuch schon bald nach Isolierung des Vitamin B6 durch Lepkovsky (1938) als Folgen eines Vitamin B6-Mangels erkannt worden (32). Durch Fütterung von Vitamin B6-freier Nahrung oder Gabe von Vitamin B6-Antagonisten war es möglich, epileptiforme Krämpfe bei verschiedenen Spezies zu erzeugen. Es zeigte sich, daß im Gegensatz zu den neurologischen Symptomen bei Mangelzuständen aller anderen B-Vitamine bei B6-Mangel die Krampfanfälle als Symptom ganz im Vordergrund standen und histopathologische Veränderungen des Nervensystems zunächst nicht feststellbar waren, was als Hinweis auf das Zugrundeliegen einer rein "biochemischen Läsion" beim Zustandekommen dieser Anfälle gewertet wurde (162). Diese Besonderheit zog starke forschersiche Bemühungen um die Aufklärung der Funktion von Vitamin B6 im Nervensystem an.

Erste klinische Beobachtungen beim Menschen machten 1948 Hawkins et al., die nach einer zwei Monate dauernden B6-Mangeldiät bei einem 55-jährigen Patienten Depressionen und Verwirrheitszustände beschrieben (76).

Snyderman et al. führten 1950 bei zwei debilen Kindern eine B6-Mangeldiät durch und lösten damit bei einem Kind nach 76 Tagen epileptiforme Krämpfe aus, die durch B6-Gabe unterbrochen werden konnten. Außerdem beobachteten sie Wachstumsstillstand und Anämie (146). Der Nachteil dieser Studien war, daß sie vollständig B6-freie Nahrung heranzogen, also keine natürliche Situation den Beobachtungen zugrunde lag; jedoch schien erwiesen, daß junge Individuen auf Veränderungen der Vitaminversorgung weit empfindlicher reagieren als Erwachsene (162).

Diese Ergebnisse fanden Bestätigung bei der Untersuchung eines Ereignisses, das sich zu Beginn der fünfziger Jahre in den USA zutrug und als "Pyridoxinmangel-epidemie" bekannt wurde. Von 1951 bis 1953 wurde bei ca. 300 Säuglingen im Alter von 1 - 4 Monaten eine Symptomenkonstellation beobachtet von generalisierten tonisch-klonischen Krampfanfällen,

oft mit Zyanose und Opisthotonus, provozierbar durch Berührung und Geräusche, begleitet von allgemeiner Hyperirritabilität (insbesondere Hyperakusis) und Hypermotorik (40). Alle diese Säuglinge waren mit einem bestimmten autoklavierten Trockenmilchpräparat gefüttert worden. Als festgestellt wurde, daß Zugabe geringer Mengen von Vitamin B6 zur Milch oder Wechsel des Milchpräparates die Symptome zum sofortigen Verschwinden brachte, vermutete man einen zu geringen Vitamingehalt dieser Milch als Ursache der Krämpfe. Der Gehalt wurde auf 60 µg pro Liter bestimmt, was also offensichtlich unter einer kritischen Grenze des Mindestbedarfs bei Säuglingen des entsprechenden Alters lag.

Coursin präziserte das beobachtete Syndrom als "borderline-deficiency", da bei keinem der Säuglinge Symptome wie Dermatitis, Anämie oder Wachstumsverzögerung auftraten, was bei einer B6-Avitaminose entsprechend den Untersuchungen von Snyderman et al. zu erwarten gewesen wäre; das heißt, es bestand ein Mangel lediglich bezüglich des Stoffwechselbedarfs des ZNS und des Aminosäurenmetabolismus, wie durch Tryptophanbelastungstests bei diesen Kindern gezeigt wurde, nicht jedoch für den Bedarf der Blutbildung oder anderer Funktionen.

Dieser relative Mangel konnte behoben werden:

- a) durch Zugabe von 200 µg Pyridoxin pro Liter Fertigmilch
- b) bei einem Kind durch einmalige Gabe von 100 mg Pyridoxin i.m.
(trotz Beibehaltung der B6-defizienten Milch für 84 Tage traten bis zum Umsetzen auf andere Nahrung keine Krämpfe mehr auf)
- c) durch Ernährung ausschließlich mit Laktosewasser. Bei Zugabe von Protein zur Nahrung traten wieder Krämpfe auf.

Eine Langzeitstudie von 20 der an Mangelkrämpfen erkrankten Kinder zeigte, daß das Wachstum, die psychische und neurologische Entwicklung und auch die EEG's der betroffenen Kinder im Beobachtungszeitraum von bis zu 3 Jahren nach Behandlung normal waren (41).

Bessey et al. beobachteten ebenfalls eine Gruppe von 20 Säuglingen mit Krampfanfällen, wobei die erhobenen Befunde Coursins Beobachtungen in einigen Punkten aufschlußreich ergänzten (16). Wie bei den mit B6-defizienter Milch ernährten Säuglingen konnten auch bei 2 ausschließlich gestillten Säuglingen Krampfanfälle beobachtet werden, die durch Pyridoxingabe zu beseitigen waren. Durch Tryptophanbelastungstests war eine Überprüfung des individuellen Bedarfs an Vitamin B6 möglich: In

der Patientengruppe genügten 0,3 mg/d Pyridoxin, um Krämpfe zu beseitigen, es waren jedoch mindestens 1,0 mg/d nötig zur Normalisierung des Belastungstests. In der Kontrollgruppe kamen 2 Kinder zur Beobachtung, die, ohne klinische Symptome zu zeigen einen pathologischen Belastungstest aufwiesen, der allerdings schon mit 0,4 mg/d Pyridoxin normalisiert werden konnte. Dies war andererseits mehr, als zur Beseitigung von Krämpfen in der Patientengruppe notwendig war.

Aus diesen Forschungen wurden unter anderem folgende Schlußfolgerungen gezogen: (2, 134)

- 1.) Die kritische Grenze der Vitamin B6-Versorgung liegt bei Neugeborenen und Säuglingen relativ hoch im Vergleich zum Angebot in der Nahrung und kann bei Schwankungen der Versorgung klinisch relevant werden (2).
- 2.) Es bestehen individuelle Unterschiede im täglichen Mindestbedarf, da zum Beispiel nur ein geringer Prozentsatz aller der mit B6-defizienter Milch gefütterten Kinder Krampfanfälle erlitt (82).
- 3.) Es gibt intraindividuelle Differenzen in der zur Beseitigung verschiedener klinischer oder biochemischer Symptome benötigten Menge an Vitamin B6, was sich zwanglos durch die Existenz von verschiedenen Enzymsystemen mit jeweils anderer Dissoziationskonstante des Enzym-Koenzym-Komplexes in den einzelnen Stoffwechselwegen erklären läßt. Die metabolischen Funktionen, die Enzyme mit hoher Affinität zum Koenzym benötigen, werden folglich am unempfindlichsten gegen Koenzymmangel sein, woraus sich sozusagen eine Rangordnung der bei einem Vitaminmangel auftretenden Symptome ableiten läßt.

Für einen Vitaminmangel auf der Ebene des Enzyms kann es verschiedene Gründe geben: (40, 134)

- 1.) Unzureichende Füllung von Gewebespeichern des Vitamins aufgrund
 - a.) ungenügenden Nahrungsgehalts
 - b.) verminderter intestinaler Resorption
 - c.) gestörten Zelltransports
 - d.) vermehrten Abbaus
 - e.) vermehrter Ausscheidung aktiver Formen
- 2.) Relativer Mangel für einen Stoffwechselweg bei starkem Koenzymbedarf eines anderen. (Hieraus erhellt zum Beispiel die Abhängigkeit des Vitamin B6-Bedarfs von der Proteinaufnahme). Dies beinhaltet auch, daß Systeme mit hoher Affinität auf Kosten derer mit geringer Affinität gesättigt werden.

- 3.) Störungen der Affinität eines Enzyms zum Koenzym durch Änderung der Apoenzymstruktur.
- 4.) Störungen der Interaktion zwischen Enzym und Koenzym durch Antimetaboliten.
- 5.) Verminderte Verfügbarkeit des Vitamins in einem Kompartiment des Organismus durch Störung des Transports.
- 6.) Verminderte Produktion der aktiven Form des Koenzyms.

Die Möglichkeit subklinischer Mangelzustände, also das Auftreten biochemischer Veränderungen ohne klinische Symptome wurde zum Beispiel von der durch Linus Pauling begründeten Orthomolekularen Psychiatrie in den Vordergrund gerückt. Der genetisch bedingte Polymorphismus von Enzymen und die daraus folgende Möglichkeit starker Schwankungen im Koenzymbedarf von Individuum zu Individuum wurde zur theoretischen Grundlage einer Therapie gemacht, die definiert wird als "Erzielung und Erhaltung psychischer Gesundheit durch Variation der Konzentrationen von normalerweise im Organismus vorhandenen Substanzen, wie zum Beispiel von Vitaminen" (113).

Diese Anwendung, auch Megavitamintherapie genannt, verwendet im Wesentlichen wasserlösliche Vitamine und prosthetische Gruppen, die in der Regel in der 10 - 100-fachen Menge des täglichen Normalbedarfs bei einer Vielzahl neurologischer Störungen appliziert werden (151). Neuerdings wird diskutiert, ob die von einigen orthomolekularen Psychiatern empfohlenen Dosierungen bei längerer Einnahme toxisch wirken können (126). Pauling empfiehlt das 25 - 100-fache des täglichen Mindestbedarfs, das entspricht bei Vitamin B-6 50 - 200 mg/die (114). Schaumburg et al. berichteten z.B. über sensorische Neuropathien und Ataxie bei Personen, die 2000 - 6000(!) mg Vitamin B-6 pro Tag über Zeiträume von 2 bis 40 Monaten zu sich nahmen. Verschiedene solcher Störungen wurden als "Megavitaminsyndrome" bekannt (126).

Bei einigen Krankheitsbildern besteht ein Imperativ für hochdosierte Vitamintherapie. Eines davon war wegweisend für Forschungen über die Bedeutung von Vitamin B-6 für das Nervensystem. Es soll im nächsten Kapitel beschrieben werden.

7.1.2 Vitamin B-6-abhängige Krampfanfälle

7.1.2.1 Fallbeschreibungen

Hunt et al. beschrieben 1954 einen Fall von Neugeborenenkrämpfen, der Ähnlichkeiten mit den Pyridoxinmangelanfällen zeigte, aber andererseits so deutlich von diesen unterschieden war, daß er als erster Fall einer eigenständigen, bisher unbekannten Erkrankung betrachtet wurde. Es handelte sich dabei um folgendes Krankheitsbild: Ein zum Termin geborenes, reifes und vitales weibliches Neugeborenes fiel 3 Stunden nach Geburt durch generalisierte Krampfanfälle auf, die durch Barbiturate nur unwesentlich gebessert wurden. Am 5. Lebenstag begannen schwere Krämpfe mit Cyanoseanfällen, die, bei normalem Serum-Ca. und Phosphat, auf Antikonvulsiva nicht reagierten. Eine am 6. Tag hinzukommende Pneumonie wurde durch Penicillingaben und, wegen rein parenteraler Ernährung, ergänzender i.m.Gabe eines Multivitaminpräparats behandelt. Während dieser Therapie war das Neugeborene krampffrei, 2 Tage nach Absetzen des Schemas jedoch begannen erneut Krämpfe, deren Ursache nicht gefunden werden konnte. Während probatorischer Gabe des vorher schon benutzten Vitaminpräparats war das Kind wieder symptomfrei. Bei Entlassung aus der stationären Behandlung wurde ein orales Vitaminpräparat gegeben: (0,6 mg/die Pyridoxin), es traten jedoch erneut ca. 50 Stunden nach der letzten i.m. Gabe Krämpfe auf, die durch 100 mg Multivit. i.m. abrupt beendet wurden. Der dadurch deutlich gewordene Zusammenhang zwischen Vitaminen und den Anfällen wurde im weiteren Verlauf noch durch Weglassversuche erhärtet und durch Therapieversuche mit jeweils nur einem der im Präparat enthaltenen Vitamine Pyridoxin als allein wirksame Komponente erkannt. Die tägliche Mindestdosis war 2 mg/die. Sie änderte sich innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 23 Monaten nicht, es traten jedoch einmal im Verlauf eines Infekts (Otitis media) trotz der Substitution Krämpfe auf. Der Tryptophanbelastungstest war bei Mutter und Kind normal, es bestand außerdem auch klinisch kein Anhaltspunkt für einen Vitamin B-6-Mangel. Das Kind war insgesamt in seiner Entwicklung deutlich retardiert (83).

Dieses Krankheitsbild kann als exemplarisch für die weiteren publizierten Fälle dieser Art gelten. Hunt et al. beschrieben dessen Besonderheit als "spontan auftretender, nur durch Pyridoxingabe korrigierbarer Zustand", wobei mit "spontan" die Unabhängigkeit von exo-

genen Einflüssen angedeutet und der Zustand vom Pyridoxinmangel unterschieden werden sollte. Die Autoren drückten diesen Gegensatz zu Mangelzuständen durch die Einführung des Begriffs "Pyridoxinabhängigkeit (Pyridoxine-Dependency)" aus.

Bislang sind über 50 Fälle publiziert worden. Einige Fallbeschreibungen sind in Tabelle 16 zusammengefaßt.

Tabelle 16 : Vitamin B-6-abhängige Krampfanfälle ; Fallbeschreibungen

Autor	Symptome	Beginn (Alter)	Liquor	Wirkung von Antikonvulsiva	Pyridoxin- Erhaltungsdosis	Latenzzeit Wirkgs. Wirkgs. beginn ende von Pyridoxin	Verlauf
Waldinger et al. 1963 (168)	generalis. ton.- klon. Krämpfe	3 h	Prot 290 mg% später norm.	leichte Besserg. später Ø Wirkg.	10 mg	"sofort" 5 d	schwere phys. u. mentale Retardg.
	Zuckungen d. Extremitäten, Apnoe	3 h	Prot 140 mg%	-	12.5 mg	"abrupt" -	normale Entwicklung
Genitz et al. 1967 (63)	tonische Anfälle (2-3 Min.Dauer) extrem Hyperirrit.	3 woch.	Prot 68 mg%	Wirksam im Verlauf einer Encephalitis	80 mg	"sofort" 7 d	Anfälle bei Marsencephalitis trotz Pyridoxin
Heeley et al. 1978 (78)	Protrahierte Anfälle, Schnappatmung	1 Tag	-	Diazepam, Paraldehyd Ø Wirkung	180 mg	- 3 d	leicht retardiert v.a. intrauterinen Beginn, Geschwisterfall
	Massive generalis. Anfälle, Opisthotonus, Apnoe	4 Std.	normal	Kein Effekt	40 mg	20 Min. 4 d	leicht retardiert
	generalis., lang anhaltende Anfälle Hyperirritabilität	2 Std.	-	-	40 mg	10 Min. 5 d	leicht retardiert
Hunt et al. 1954 (83)	generalis. ton.- klon. Anfälle, Cyanose	3 Std.	Prot. 100 mg%	Barbiturate schwach wirksam	2 mg	15 Min. 2 d	mental retardiert

Fortsetzung von Tabelle 16 : Vitamin-B-6-abhängige Krampfanfälle ; Fallbeschreibungen

Autor	Symptome	Beginn (Alter)	Liquor	Wirkung von Antikonvulsiva	Pyridoxin- Erhaltungsdosis	Latenzzeit Wirkgs. Beginn Wirkgs. Ende von Pyridoxin	Verlauf
Bejsovec et al. 1966 (13)	"Lightning convulsions", Hyperirritabilität, wechselnd mit Atonie, Nystagmus	bei Geburt	-	Keine Wirkung	30 mg	5 Min. 2 d	leicht retardiert; v.a. intrauterinen Beginn, Geschwisterfall
Clarke et al. 1979 (36)	Linksseitige fokale Krämpfe	28 Std.	Prot. 262mg%	Phenobarbital 5mg/kg t.m. ohne Wirkung	200 mg	Sekunden	normale Entwicklung
Scriver 1960 (135)	generalis. ton.-klon. Anfälle	1 Std.	Prot. 100 mg% 54 mg%	Barbiturate in hoher Dosierung wirken schwach	11 mg	Minuten 7 d	normale Entwicklung

Das "klassische" Bild der pyridoxinabhängigen Krampfanfälle ist also gekennzeichnet durch häufig generalisierte, selten seitenbetonte oder fokale Krämpfe, die Stunden bis wenige Tage nach Geburt auftreten (auch intrauteriner Beginn ist belegt), mit den gebräuchlichen Antikonvulsiva nicht oder nur schwach beeinflussbar und häufig interparoxysmal von Hyperirritabilität begleitet sind. Die Erkrankung ist familiär, der Vererbungsmodus wird als autosomal rezessiv angenommen. Die Behandlung ist praktisch ausschließlich durch Pyridoxingaben möglich, wobei die notwendige Dosis individuell sehr verschieden ist (2 - 200 mg/die), aber generell höher liegt als zur Therapie eines Pyridoxinmangels notwendig ist. Parenterale Pyridoxingabe zeigt prompte Wirkung (Sekunden bis Stunden), die Substitution muß dauernd durchgeführt werden. Beim Weglassversuch ist die Latenz bis zum Wiederauftreten von Symptomen 2 Tage bis 1 Woche. Häufig sind die betroffenen Neugeborenen schon bei der Geburt auffällig, etwa durch mekoniumhaltiges Fruchtwasser oder intrauterine Asphyxie (13,168).

Die Prognose ist abhängig von der Latenz zwischen Auftreten der Symptome und Behandlungsbeginn, unbehandelte Kinder sterben in der Regel bald, spät behandelte zeigen meist mentale und statische Retardierung, bei sofort behandelten ist die Entwicklung in der Regel normal. Typisch scheint auch das Auftreten von Anfällen in physischen Stresssituationen zu sein, wie z.B. bei Infektionskrankheiten.

7.1.2.2 Stoffwechseluntersuchungen

Der Tryptophanbelastungstest wurde in zahlreichen Untersuchungen, auch vom Erstbeschreiber, durchgeführt. Bis auf einen der uns bekannten Fälle gaben die Tests keinen Hinweis auf einen Vitamin B-6-Mangel. Bedeutsam ist hierbei der Gegensatz zu Vitamin B-6-Mangelkrämpfen, wo in allen Fällen der Test pathologisch ist (13,16,83,135).

Die Aktivität der Vitamin B-6-abhängigen Transaminasen (GOT und GPT) in Erythrozyten und im Plasma wurde, soweit bestimmt, als normal befunden. Außerdem entsprach die in-vitro-Stimulierbarkeit dieser Enzyme durch PLP derjenigen bei Normalpersonen (13,63).

In einigen Arbeiten wurden die Plasmakonzentrationen verschiedener B-6-Metaboliten bestimmt und in allen Fällen normal gefunden (42,63).

Gentz et al. bestimmten bei einem Patienten PLP-Werte nach Absetzen der B-6-Substitution (mindestens 2 Wochen Zwischenzeit). Sie erhielten 14 - 26 ng/ml. Während der Substitution (20 mg/die Pyridoxin) lagen die Werte bei 49,5 - 109 ng/ml, was den Verhältnissen bei Normalpersonen entspricht.

Exzessive Verluste von aktiven Formen des Vitamin B-6 und verringerte Exkretion des eigentlichen Ausscheidungsmetaboliten Pyridoxsäure wurden, bei normalen Blutspiegeln der aktiven Vitamin B-6-Formen, von einigen Autoren beobachtet (42,78,135).

Gentz et al. bestätigten die verminderte Ausscheidung von Pyridoxsäure, fanden jedoch bei einer Isotopenstudie die Eliminationsrate von Vitamin B-6 aus Körperreservoirs normal (63).

Ergänzend hierzu können die Ergebnisse von Heeley et al. betrachtet werden, die feststellten, daß Patienten mit Vitamin B-6-abhängigen Krämpfen nach oraler Pyridoxinbelastung normal PLP produzierten, jedoch eine schnellere Plasma-Clearance vorhanden war. Erhöhte Ausscheidung von Pyridoxin vervollständigte das Bild. Heeley et al. postulierten eine defekte Bindung von PLP an Plasmaalbumin. Die daraus folgende erhöhte Konzentration von freiem PLP im Plasma könnte die Pyridoxalkinase inhibieren, was zu einer Akkumulation und vermehrten Ausscheidung von Pyridoxin führen würde, da dieses nicht an Proteine gebunden wird (78). Resultat könnte damit eine verminderte Verfügbarkeit aktiver Metaboliten im Organismus sein.

Heeley et al. konnten ihre Befunde in einer 2. Versuchsreihe an den gleichen Patienten ein Jahr später nicht reproduzieren. Der PLP-Metabolismus im Blut war zu diesem Zeitpunkt vollkommen normal.

7.1.2.3 Erweitertes klinisches Spektrum der Vitamin B-6-abhängigen Krämpfe

Das neurologische Syndrom der Vitamin B-6-Abhängigkeit ist klinisch definiert, z.B. durch die Reaktion der Symptome auf die spezifische Therapie und die Abwesenheit bestimmter Zeichen des Vitamin B-6-Mangelsyndroms.

Das oben beschriebene in den wesentlichen Punkten einheitliche Bild der Vitamin B-6-Abhängigkeit wurde jedoch in einigen neueren Arbeiten erweitert, im Sinne eines breiteren und inhomogeneren Spektrums von Symptomen und einer größeren Schwankungsbreite der bekannten typischen Befunde.

Brenner und Wapnir (26) beschrieben 1978 ein dreijähriges Mädchen, das während einer Isoniazid-Therapie Hyperirritabilität, Hyperkinese und Schlafstörungen entwickelte, die auf Pyridoxingabe gut ansprachen. Auch nach Absetzen der Isoniazid-Therapie waren weiterhin Dosen von 300 - 400 mg/die Pyridoxin für das Kind notwendig, um symptomfrei zu bleiben. Placebos waren unwirksam. Beim Weglassversuch kehrten nach einer Latenz von ca. 2 Wochen Verhaltensauffälligkeiten, Hyperirritabilität und Parästhesien zurück. Das Kind war dann extrem nervös, verstört und übelgelaunt, empfand den Kontakt von Kleidung mit der Haut als unerträglich, klagte über schmerzende und brennende Füße und wurde von Schlaflosigkeit und Alpträumen geplagt. Das EEG war dabei normal. Während einer behandlungsfreien Zeitspanne, in der nur Placebo gegeben wurde, betrug der PLP-Gehalt des Plasmas 11 ng/ml. (Normalwerte von Brenner et al.: 3,6 - 18,0 ng/ml).

Nach 7 Jahren Behandlungsdauer verlor sich die Pyridoxinsensibilität. Gabe von Pyridoxin und Zink brachte dann auch keine Besserung mehr, jedoch Thiamin + Pyridoxin waren wirksam.

Ein Bruder des Kindes zeigte eine ähnliche Symptomatik, die bei Perioden von körperlichen Belastungen oder bei Infektionserkrankungen auftrat und pyridoxinsensibel war.

Die Autoren wiesen auf die Abhängigkeit der Serotoninsynthese von Vitamin B-6 hin. Insbesondere die bei diesem Fall beobachteten Schlafstörungen rückten diesen Neurotransmitter ins Blickfeld, wegen der bekannten Abhängigkeit des REM-Schlafs von Serotonin. Brenner et al. untersuchten den Ausscheidungsmetaboliten des Serotonin im Urin,

schlossen aber trotz Normalbefunds die Möglichkeit einer Serotonin-stoffwechselstörung nicht aus, da z.B. auch bei Hyperkinetikern trotz erniedrigten Plasmaspiegels von Serotonin die Urinspiegel von 5-Hydroxyindolacetat, des Ausscheidungsmetaboliten, normal sein können. Damit wurde eine Verbindung hergestellt zu den Befunden bei Patienten mit hyperkinetischem Syndrom. Diese Kinder weisen verminderte Blutserotoninspiegel auf und reagieren positiv auf Pyridoxingabe, sowohl klinisch als auch durch Normalisierung des Serotoninspiegels (18,37,26).

Weitere Arbeiten beschreiben in Symptomen und Verlauf atypische Fälle von pyridoxinabhängigen Krämpfen, deren Hauptmerkmale kurz zusammenge stellt seien:

Krishnamoorthy (89) berichtete über einen Jungen, der im Alter von 14 Monaten erstmals Krampfanfälle zeigte, die bis zum Alter von 22 Monaten mit Antikonvulsiva behandelt wurden, allerdings ohne guten Erfolg. Bei einer Frequenz von 5 - 14 Anfällen pro Tag wurde dann 75 mg/die Pyridoxin versucht, mit dramatischer Besserung sowohl klinisch als auch im EEG. Unter einer Dauertherapie mit 25 mg/die Pyridoxin war das Kind vollkommen krampffrei bis 20 Monate nach Beobachtungsbeginn. Anamnestisch wurde der Verdacht auf intrauterine Krämpfe geäußert. Es bestand eine leichte intrauterine Asphyxie bei der Geburt.

Bankier et al. (8) beschrieben Kinder, die eindeutig Vitamin B-6-abhängige Krampfanfälle aufwiesen, jedoch ebenfalls mit untypischen Erscheinungsbildern.

In einem Fall begannen multifokale motorische Anfälle am 8. Lebens tag. Phenytoin brachte Besserung für 5 Tage, dann traten erneut Krämpfe auf, die erst durch i.v. Megavitamingabe (50 mg Pyridoxin + andere Vitamine) ohne Gabe von Antikonvulsiva beherrschbar waren. Nach einem Monat wurde die Megavitamintherapie abgesetzt und eine Therapie mit Barbiturat, Phenytoin und Valproat eingeleitet. Das Kind war hierunter 5 1/2 Monate lang krampffrei, dann traten jedoch wieder Anfälle auf, die nur durch Pyridoxin zu unterbrechen waren (prompte Reaktion 3 Min. nach 100 mg i.v.). Unter einer Dauertherapie von 75 mg/die Pyridoxin blieb das Kind krampffrei, jedoch retardiert.

In weiteren Fällen fand sich unter anderem:

- a) später Beginn von Krampfanfällen (6 Wochen Alter)

- b) lange krampffreie Perioden, nur unter Antikonvulsiva, ohne Vitamin B-6 (1 - 3 Monate)
- c) nicht primär mit der B-6-Abhängigkeit assoziierte Krampftypen, z.B. infantile Spasmen, fokale Anfälle.

Schmidt (130) fand bei einem Neugeborenen ein typisches Bild: Beginn von grobschlägigen Hyperkinesen eine Stunde nach Geburt, leichte Besserung nach 10 mg Pyridoxin i.m., vollständiges Verschwinden aber erst nach 60 mg Pyridoxin p.o. . Bei einem Weglassversuch trat wieder Hyperirritabilität auf, ebenso während eines fieberhaften Infekts. Trotz dieser deutlichen Pyridoxinsensibilität konnte die Behandlung mit Pyridoxin nach 2 Monaten abgesetzt werden, ohne daß wieder Symptome auftraten. Das Kind entwickelte sich vollkommen normal (Beobachtungszeitraum 6 Monate).

Diese atypischen Fälle von Vitamin B-6-abhängigen Krampfanfällen scheinen ein Bindeglied zu bilden zwischen dem Syndrom der Vitamin B-6-Mangelkrämpfe und der typischen Vitamin B-6-Abhängigkeit. Es scheint tatsächlich keine ganz klare Trennung zwischen diesen Krankheitsbildern zu geben, sondern vielmehr fließende Übergänge zwischen den extremen Möglichkeiten der Symptommfreiheit selbst bei suboptimaler Gabe von Vitamin B-6 bei der Mehrzahl von Säuglingen und dem Auftreten von Krampfanfällen trotz Substitution mit 100-facher Normaldosis bei einigen wenigen.

Möglicherweise deuten solche Abortivformen der Pyridoxinabhängigkeit auf eine Heterogenität des Krankheitsbildes im Sinne verschiedener Ursachen oder auf Kombinationen verschiedener Störungen beim gleichen Patienten hin (43).

7.1.2.4 Biochemische Untersuchungen

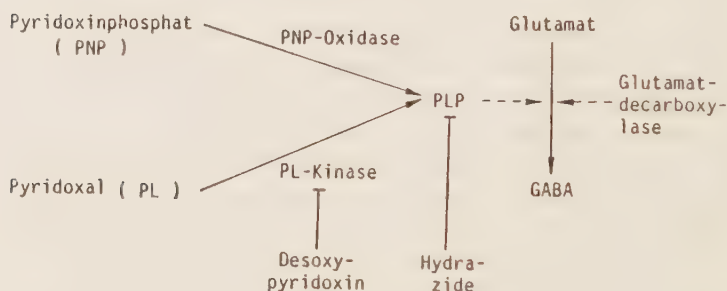
Die Pyridoxinmangel-epidemie und Hunts Beschreibung der Pyridoxinabhängigkeit fiel in einen Zeitraum des starken Aufschwungs der Forschung an Neurotransmittern, die durch Eugene Roberts' Entdeckung einer Aminosäure, die ausschließlich im Gehirn, und dort in grossen Mengen vorkam, initiiert wurde (121). Diese Aminosäure wurde als γ -Amino-Buttersäure (GABA) identifiziert, die Ackermann schon 1910 in Bakteriensuspensionen gefunden hatte. Roberts et al. fanden auch das GABA-synthetisierende Enzym, die Glutamatdecarboxylase (GAD) im Gehirn. Dessen Abhängigkeit von PLP war bereits 1946, also 4 Jahre vor den Arbeiten von Roberts et al. durch Gale et al. beschrieben worden (61).

1954, als die Diskussion über den Vitamin B-6-Mangel und seine Beziehung zu Krampfanfällen im Gange war, wußte man über die Funktion von PLP im Zentralnervensystem lediglich, daß es die Decarboxylierung von Glutamat zu GABA kokatalysiert (2).

Roberts favorisierte zwar eine physiologische Rolle von GABA mit spezifischer regulativer Wirkung auf Synapsen und damit die zelluläre Erregbarkeit im ZNS, es dauerte jedoch bis 1956, bis seine Vermutung erhärtet wurde (122). Dies wurde erreicht durch Versuche an Hunden, bei denen die Wirkung krampfauslösender Substanzen, die direkt auf die Hirnrinde aufgebracht wurden, von GABA-Applikation antagonisiert wurde (77). Dies war einer der ersten Schritte auf einem bis heute fort-dauernden Weg zur definitiven Sicherung von GABA als Neurotransmitter. 1957 kamen Ergebnisse hinzu, die zeigten, daß die Applikation bekannter Konvulsiva, wie z.B. der Hydrazine, deren Hemmwirkung auf GAD schon Roberts et al. 1951 beschrieben hatten, zu einer Abnahme von GABA im Gehirn führt, und daß PLP als Antidot gegen diese Substanzen wirkt (6,87). Wiegand zeigte, daß die konvulsive Wirkung einiger dieser Substanzen auf einer Komplexbildung mit PLP beruht, wodurch PLP-abhängige Enzyme gehemmt werden (172).

Killam und Bain hatten 1957 die Pyridoxalkinase im Gehirn nachgewiesen (87). McCormick und Snell zeigten die kompetitive Hemmbarkeit der Kinase durch Hydrazide und Desoxypyridoxin (Vitamin B-6-Antimetabolit) (105). Bain und Williams fanden einen extrem verringerten PLP-Gehalt im Mäusegehirn nach Desoxypyridoxin und Hydraziden, die beide Krämpfe auslösen und in diesen Versuchen zu erhöhter Anfälligkeit für akustisch oder optisch ausgelöste Krämpfe bei Versuchstieren

fürhten (5). Damit waren die konvulsive Wirkung von Hydraziden und ihre GAD-hemmende Rolle in Beziehung gebracht über die Beeinflussung des B-6-Stoffwechsels. Folgendes enzymatisches System wurde angenommen:



Im Zusammenhang mit den pyridoxinsensiblen Krämpfen hatten Scriver et al. 1964 in Anlehnung an die Befunde bei anderen Vitamin B-6-Abhängigkeitssyndromen wie z.B. der pyridoxinsensiblen Anämie oder der Xanthurenacidurie die Vermutung geäußert, daß bei dem pyridoxinabhängigen Krampfleiden ein Apoenzymdefekt vorliegen könnte, der die Bindung des Coenzyms an das Apoenzym behindert (133).

Frimpters Arbeiten über die Cystathioninurie ergaben, daß bei dieser Erkrankung die Vermutung tatsächlich zutraf. Er fand zwar Cystathioninase in Geweben erkrankter Kinder, die Aktivität dieses Enzyms erreichte jedoch erst nach Zugabe hoher PLP-Konzentrationen in vitro normale Werte (60).

Der Nachweis eines ähnlichen Defekts der GAD bei den B-6-abhängigen Krämpfen war zu der Zeit nicht möglich, da man annahm, daß dieses Enzym nur im Gehirn vorkommt. Es war damit dem forschersichen Zugriff beim Menschen entzogen. Die Situation änderte sich jedoch, als Zachmann et al. 1966 freie GABA in der Niere nachwiesen (177). Da das Vorkommen von GABA im Blut nicht bekannt war, wurde eine in situ-Synthese durch GAD in der Niere angenommen (171).

Scriver bestätigte dies 1969 durch den Nachweis von GAD in Homogenaten von Rattennieren (132). Die dadurch eröffnete Möglichkeit, den

vermuteten Apoenzymdefekt von GAD anhand von Nierenbiopsien bei Patienten mit pyridoxinabhängigen Krampfanfällen zu studieren, nutzten Yoshida et al. im Biopsiematerial eines 1 1/2 jährigen Jungen, bei dem die Erkrankung gesichert war (176). Sie fanden einen verminderten Einbau von ^{14}C aus Glutamat in GABA, der durch Inkubation des Systems mit PLP normalisiert werden konnte. Andererseits jedoch war die Produktion von $^{14}\text{CO}_2$ aus ^{14}C -Glutamat normal und der Stimulationsversuch führte zu erhöhter $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung.



Diese Ergebnisse wurden relativiert durch die Entdeckung verschiedener Typen von GAD (67), die sich deutlich voneinander unterscheiden: Typ I wird durch Anionen und Aminoxyacetat gehemmt, Typ II wird von den gleichen Substanzen aktiviert. Der Typ I katalysiert die schnelle Decarboxylierung von Glutamat, er findet sich nur im Gehirn. Typ II tritt in Gliazellen, Niere, Herz, Nebenniere und Hypophyse auf (108). Der damit evidenten Notwendigkeit, GAD I bei Pyridoxinabhängigkeit im Gehirn zu studieren, konnten Lott et al. 1978 nachkommen (94). Sie untersuchten Autopsiematerial eines Kindes mit B-6-abhängigen Krämpfen, das im Verlauf einer schweren Gastroenteritis nicht weiter substituiert wurde und im Status epilepticus verstarb (13 1/2 Jahre, Kind 1 in Tabelle 16). Sie fanden die GABA-Konzentration im frontalen und occipitalen Kortex vermindert, die Glutamatkonzentration erhöht. GAD-Aktivität war erst nach Stimulation mit PLP (0,5 mM) feststellbar. Interessanterweise war die PLP-Konzentration im frontalen Kortex nur etwa 50 % derjenigen in Kontrollautopsien, im occipitalen Kortex war sie normal. Außerdem wurde in beiden Regionen erhöhter Cystathioningehalt festgestellt. Die Autoren diskutierten für die letzteren Befunde entweder einen zusätzlich bestehenden Mangel an Cystathioninase-Aktivität, oder eine Störung der PLP-Synthese. Die neuropathologischen Befunde entsprachen einer Gliazellenproliferation bei neuronalem Zellverlust und allgemeinem Verlust weißer Substanz, insbesondere im Thalamusbereich.

Es fällt auf, daß sich alle diese Befunde auch unter dem Gesichtspunkt einer verminderten Verfügbarkeit von Vitamin B-6 im Gehirn, etwa durch einen gestörten Transport an der Bluthirnschranke, interpretieren ließen. Untersuchungen zu den Transportmechanismen von Vitamin B-6 im ZNS zeigten, daß diese aktive Prozesse sind, die höchstwahrscheinlich an die Funktion eines phosphorylierenden Enzyms gebunden sind (z.B. Pyridoxalkinase). Dies trifft sowohl beim Transport von Vitamin B-6 vom Blut in den Liquor zu als auch für den Transport vom Liquor nach intrazellulär. Es wurde noch nicht untersucht, ob etwa ein Enzymdefekt auf der Ebene des Vitamin B-6-Transports für die Gegebenheiten bei der B-6-Abhängigkeit verantwortlich sein könnte. Die Ergebnisse von Lott et al. jedenfalls scheinen eine solche Möglichkeit nicht auszuschließen, sie ließen sich vielmehr einem solchen Konzept zwanglos unterordnen. Beispielsweise wurde bei Tierversuchen während Vitamin B-6-Mangels ein verminderter PLP-Gehalt im Gehirn, verminderte GAD-Aktivität, Verminderung cerebraler Sphingolipide, demgegenüber aber Erhöhung der Konzentration von Cystathionin, Citrullin und Taurin bei gleichzeitiger Krampfsymptomatik gefunden (120).

Nimmt man einen singulären Defekt der GAD als Ursache für B-6-abhängige Krampfanfälle an, ließen sich die von Lott et al. gefundenen niedrigen PLP-Werte im Gehirn nur schwer erklären. Man müßte vielmehr, wegen der therapeutischen Pyridoxingaben, normale oder erhöhte Werte im Gehirn erwarten.

7.1.3 Beziehungen zwischen Vitamin B-6 und GABA im Zentralnervensystem

Die am Beispiel der Vitamin B-6-abhängigen Krampfanfälle gezeigten Zusammenhänge zwischen dem Neurotransmitter GABA und PLP und die daraus versuchte Erklärung der klinischen Befunde nimmt die Gültigkeit des biologischen Regelungsprinzips der Inhibition und Disinhibition auch für Regelungsvorgänge im Gehirn an. Der Nachweis der morphologischen Korrelate dieses Prinzips, wie z.B. von Rezeptoren, exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen und Transmittern, die sich jeweils einer bestimmten Art von Synapsen zuordnen lassen, also ebenfalls als "erregend" oder "hemmend" zu bezeichnen sind, und die Tatsache, daß diese Transmitter in Neuronen produziert werden, wozu enzymatisch katalysierte Reaktionsschritte notwendig sind, zeigt, daß im Gehirn die Regelungsprinzipien enzymatischer Reaktionen bei der Aufrechterhaltung der neuronalen Aktivität ineinandergreifen mit der kybernetischen Regelung durch komplexe Verschaltung von Axonen.

In diesem Konzept besitzt PLP eine klar definierte biochemische Rolle (Coenzym) und klinische Wirkung (Antikonvulsiv).

Es ist dies jedoch nur ein Ausschnitt aus den bisher nachgewiesenen oder begründet vermuteten Wirkungen von PLP im Nervensystem.

Pointiert ausgedrückt, reicht z.B. die Spannweite der klinisch beobachtbaren Wirkungen von PLP von der bekannten antikonvulsiven Wirkung (128) bis zur Auslösung von letalen Krampfanfällen bei Applikation von PLP unter bestimmten Bedingungen (48). Ähnlich variabel sind die biochemischen Befunde. Im Folgenden sollen einige Aspekte aus der neueren Literatur, die sich mit der Erhellung der zugrundeliegenden Mechanismen befaßt, zusammengestellt werden.

7.1.3.1 Überblick über den GABA-Stoffwechsel

Ebadi betont, daß fast alle Substanzen, denen eine Rolle als Neurotransmitter zugeschrieben wird, unter Cokatalyse von Vitamin B-6 synthetisiert oder metabolisiert werden. Darunter sind Dopamin, Norepinephrin, Serotonin, Tyramin, Tryptamin, Taurin, Histamin und GABA (49). Mit am intensivsten sind die Beziehungen zwischen Vitamin B-6 und dem inhibitorischen Transmitter GABA erforscht worden.

Die schon historische Dimension des Beginns dieser Forschungsrichtung wurde schon in 7.1.2.4 angerissen.

Zu Beginn sei ein Überblick über die im weiteren erwähnten Stoffwechselwege und Substanzen des GABA-Metabolismus gegeben.

Die für die Definition eines Stoffs als Neurotransmitter geforderten Eigenschaften, die von GABA erfüllt werden sind in Abb.24 dargestellt:

- a) GABA wird in den Neuronen, deren Aktion es übertragen soll, durch enzymatische Reaktion synthetisiert.
- b) GABA wird unter Bedingungen, die eine Inhibition hervorruufen, freigesetzt.
- c) Es gibt Rezeptoren, an die spezifisch GABA gebunden wird.
- d) Wird GABA an einen spezifischen Rezeptor gebunden, so folgt eine Erhöhung der Cl-Permeabilität dieses Neurons, also eine Hyperpolarisation und damit Inhibition.
- e) Es gibt in Nervenzellen Transportsysteme für GABA, die zu schnellem, aktivem Transport entgegen einen Konzentrationsgradienten fähig sind.

Hemmstoffe und Agonisten der Stoffwechselwege des GABA-Shunts und der Transmitterwirkung sind in Abb.24 eingezeichnet, sofern eine Beziehung zu Vitamin B-6 nachgewiesen ist.

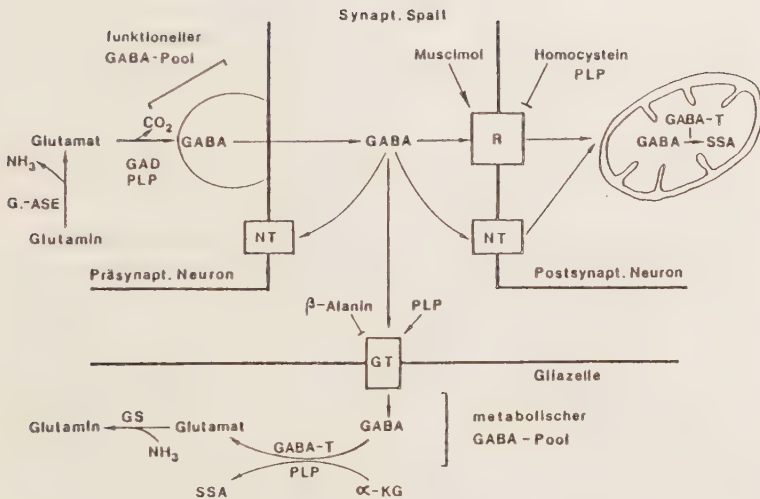


Abb. 24 : Stoffwechsel, synaptischer Transport und Kompartimentierung von GABA im ZNS .

Abkürzungen : R : Rezeptor ; NT : Neuronales Transportsystem ; GT : Gliales Transportsystem ;

GABA-T : GABA-Transaminase

GAD : GABA-Decarboxylase

GS : Glutamin-Synthetase

G.-ASE : Glutaminase

α-KG : α-Ketoglutarat

SSA : Succinatsemialdehyd

Literatur : (9, 31, 35, 84, 102, 157, 160) .

7.1.3.2 Synthese und Abbau von GABA

Wie aus Abb. 24 ersichtlich, ist nicht nur die Glutamatdecarboxylase (GAD), sondern auch das GABA-katabolisierende Enzym, die GABA-Transaminase (GABA-T) PLP-abhängig. Man könnte also annehmen, daß PLP-Mangel wegen verminderten Abbaus von GABA zu dessen Konzentrationserhöhung beitragen könnte. Trotzdem resultiert PLP-Mangel in GABA-Verminderung. Eine Erklärung hierfür wurde von Roberts et al. gegeben, die das Verhältnis der relativen Affinitäten von GAD und GABA-T zu PLP als ca. 1:10 bestimmten; PLP wird also bei Mangelversorgung eher von GAD dissoziieren als von GABA-T und damit das Reaktionsgleichgewicht zuungunsten von GABA verschoben werden (10).

Die Abhängigkeit der GABA-Synthese vom PLP-Metabolismus ist gut untermauert. So besteht z.B. eine enge Korrelation zwischen dem jeweiligen PLP- und GABA-Gehalt sowie der GAD-Aktivität in verschiedenen Gehirnregionen, die Ebadi et al. untersuchten (50). Sie fanden, daß die Konzentration von PLP und die Aktivität von GAD positiv korreliert waren ($r = 0,64$), ebenso die Aktivitäten von Pyridoxalkinase und GAD ($r = 0,52$).

Auch andere wichtige Enzyme des Gehirnstoffwechsels sind von PLP abhängig und ihre Aktivitäten zeigen Übereinstimmungen mit der PLP-Verteilung. Es gibt jedoch Hinweise dafür, daß konvulsive Wirkungen von PLP-Antagonisten speziell von dem Zusammenspiel zwischen PLP und GABA abhängen. Sawaya et al. (125) verglichen die Wirkungen von PLP-Antagonisten auf die Aktivität des ZNS. Unter diesen Substanzen befinden sich einige, die selektiv verschiedene Enzyme des Aminosäurenstoffwechsels im Gehirn hemmen. Es zeigte sich, daß die Enzymhemmung im GABA-System (GAD) eine weit bedeutendere Rolle in der Krampfauslösung spielte als z. B. die Hemmung der Synthese der Monoamine (L-aromatische Aminosäurendecarboxylase), bei der sich lediglich eine leichte Beeinflussung der Krampfschwelle fand.

Unter den Substanzen, die die Aktivität des ZNS beeinflussen, sollen einige mit nachgewiesener Wirkung auf das GABA-System betrachtet werden. Man wird sie nach ihrer "Nettowirkung" grob trennen in solche, die die Erregbarkeit erhöhen und andere, die vorwiegend aktivitätsmindernde (antikonvulsive) Wirkung zeigen.

Auf der Ebene von GABA-Synthese und Abbau wird man, in Anbetracht der inhibitorischen Wirkung dieses Transmitters, folgende Einteilung wählen:

"Konvulsiva" : Stoffe, die die Synthese von GABA hemmen.

- a) PLP-Antagonisten
- b) Substratkompetitive Hemmer von GAD

"Antikonvulsiva" : Stoffe, die den Abbau von GABA hemmen.

- a) Substratkompetitive Hemmung von GABA-T
- b) Irreversible Hemmung von GABA-T

PLP-Antagonisten

Diese findet man in der gut untersuchten Gruppe der Hydrazin-Derivate. Einige davon wirken durch Bindung mit PLP (Hydrazonbildung), das sind z.B. Isoniazid, Thiosemicarbazid (TSC). Das wichtigste durch diese Inaktivierung des Coenzym beeinflussbare Enzym des PLP-Stoffwechsels ist die Pyridoxalkinase. Appliziert man PLP-Hydrazone in vivo, so ist nach einer krampfauslösenden Dosis sowohl eine Verminderung der GAD-Aktivität als auch der PLP-Konzentration im Gehirn festzustellen, was auf die wahrscheinlich sekundäre Hemmung von GAD hinweist. Diese Korrelation eines verminderten PLP-Gehalts mit gesenkter GAD-Aktivität konnte nur im Synaptoplasma festgestellt werden und fand sich in keiner anderen subzellulären Fraktion, obwohl GAD und PLP auch in anderen Zellkompartimenten nachweisbar sind (115).

Doppelt substituierte Hydrazine ($R - H - N:N - H - R$) bilden keine Hydrazone mit PLP und zeigen in der Regel auch keine konvulsive Wirkung (108). Doppelt methylsubstituiertes Hydrazin jedoch inhibiert GAD. Bei solchen konvulsiven, nicht hydrazonbildenden Derivaten besteht aber kein Zusammenhang zwischen PLP-Spiegeln und Krampfauslösung (108).

Weitere Hinweise auf eine direkte Beziehung zwischen PLP und GABA-Synthese geben Untersuchungen mit Pyridoxinanalogen (Antimetaboliten). Diese wirken ebenfalls konvulsiv durch Hemmung der Pyridoxalkinase und darausfolgende PLP-Verarmung oder kompetitiv mit PLP an der GAD. So ausgelöste Krämpfe können durch systemische Gabe von Pyridoxin

verhindert werden (79,80).

Die GAD-Hemmung nach Antimetabolitengabe ist in vitro durch Applikation von PLP reversibel.

Die von PLP-Antagonisten ausgelösten Krämpfe, z.B. bei Pavianen beobachtet, beginnen fokal, typischerweise nach einer relativ langen Latenzzeit von 1 - 6 Stunden, sie imponieren als kurzdauernde, über einen Zeitraum von mehreren Stunden in regelmäßigen Intervallen auftretende Krämpfe. Dieses intermittierende Auftreten ist charakteristisch, es wird damit erklärt, daß die Krampfaktivität zu metabolischen Veränderungen führt, die die GAD-Aktivität wieder steigern, wie z.B. das Absinken des pH durch Erhöhung des pCO_2 und der Laktatkonzentration im ZNS (pH-Optimum von GAD: 7,0), oder die Hypoxie, die wegen der bekannten NAD^+ -Verminderung zu einem Absinken der GABA-Transaminaseaktivität führt. Beide Einflüsse würden also die GABA-Konzentration wieder erhöhen und die Krämpfe beenden. Hierdurch könnte ein zyklischer Effekt begründet werden (109).

Substratkompetitive Hemmung von GAD

Diese ist z.B. durch 3-Merkaptopropionsäure (3-MPA) möglich (109). Dieses Konvulsivum erzeugt Krämpfe mit einer Latenzzeit von nur ca. 3 Minuten nach intraperitonealer Injektion, ein deutlicher Gegensatz zu der längeren Latenzzeit bei Anwendung von Pyridoxinantimetaboliten, deren Wirkort sozusagen weiter vom Endprodukt entfernt ist.

3-MPA konkurriert mit Glutamat um die Bindungsstelle am Enzym und verringert dadurch die GABA-Synthese. Der verringerten Aktivität von GAD und gesenktem GABA-Gehalt stehen nach systemischer 3-MPA-Applikation jedoch eine erhöhte PLP-Konzentration und eine Erhöhung der Pyridoxalkinaseaktivität im Gehirn gegenüber (73). Dieser Befund wird schlüssig, betrachtet man ihn im Zusammenhang mit Untersuchungen, die eine Feedback-Inhibition der Pyridoxalkinase durch GABA nachwiesen (1). Beim Wegfall dieser Inhibition, wie z.B. nach GAD-Hemmung wird folglich vermehrt PLP produziert werden.

Hemmung des Abbaus von GABA durch GABA-Transaminase (GABA-T)

Interessant ist die Wirkung der schon im Kapitel über GAD-Hemmer besprochenen Hydrazinderivate. Der Wirkungsmechanismus eines Teils dieser Substanzen, nämlich die Hydrazonbildung mit PLP, die das Coenzym inaktiviert, läßt erwarten, daß die Hydrazide neben der GAD auch die PLP-abhängige GABA-T hemmen. Das ist bei vielen dieser Substanzen der Fall, trotzdem wirken sie alle krampfauslösend.

Meldrum wies darauf hin, daß die konvulsive Wirkung der Hydrazide nicht immer begleitet ist von einer Verringerung des GABA- oder PLP-Gehalts im Gehirn. Er präziserte den Sachverhalt dahingehend, daß, sofern ein Hydrazid die GAD-Aktivität um 40 % hemmt, Krämpfe auftreten, ganz unabhängig davon, wie stark gleichzeitig die GABA-T gehemmt ist (108). Ein Beispiel dafür gibt die Anwendung von Hydrazin. Eine Dosis von 1600 $\mu\text{mol/kg}$ bei Ratten inhibiert die GAD um 86 %, die GABA-T um 93 %. Das prominentere Symptom bei einem solchen Versuch waren zwar Krampfanfälle, trotzdem fand man ebenfalls eine begleitende Depression cerebraler Aktivität (108).

Ein weiteres Beispiel ist die Anwendung von Hydroxylamin, eines selektiven Hemmers der GABA-T. Man kann mit dieser Substanz einen dosisabhängigen antikonvulsiven Effekt erzielen, der mit signifikanten Erhöhungen der ZNS-Spiegel von GABA einhergeht. Trotzdem ist diese Substanz nicht in der Lage, die durch den PLP-Antagonisten und GAD-Hemmer Thiosemicarbazid ausgelösten Krämpfe zu unterdrücken, obwohl dieser ebenfalls die GABA-T leicht inhibiert. Man findet also bei einem solchen Versuch Krampfanfälle bei erhöhtem GABA-Spiegel im Gehirn (11).

Einer Erklärung dieser Phänomene führt die Frage nach der funktionellen Bedeutung der angesammelten GABA-Menge näher. Konkret heißt dies: Die Synthese von GABA, das als Neurotransmitter wirksam werden kann, also in den synaptischen Spalt freigesetzt wird, findet nur präsynaptisch statt. Man bezeichnet diese Teilmenge als "Transmitterpool". Meßbarer Parameter für den Umsatz in diesem Pool ist die GAD-I-Aktivität. Der Abbau von GABA, durch GABA-T katalysiert, erfolgt aus einem "metabolischen Pool", der sich hauptsächlich in postsynaptische Strukturen und Gliazellen befindet, und durch den aktiven GABA-Einwärtstransport gespeist wird. Parameter für den Umsatz dieses Pools ist die GABA-T-Aktivität, die im Synaptoplasma nicht nachweisbar ist. Der "metabolische Pool" beinhaltet 72 % des Gesamt-GABA, der Transmitterpool nur 28 %. Man muß hierbei allerdings berücksichtigen, daß die Gliazellen, die den metabolischen Pool beinhalten, 96 % des Ge-

hirnvolumens einnehmen, die GABA-ergischen Nervenenden (Transmitterpool) nur ca. 4 % (9).

Es geht daraus hervor, daß die entscheidenden, funktionell wirksamen aber quantitativ geringfügigen Veränderungen des Transmitterpools sehr leicht verschleiert werden können durch quantitativ größere, aber funktionell unbedeutende Änderungen des metabolischen Pools.

Auch der Metabolismus von Vitamin B 6 wurde unter diesem Aspekt erforscht. Horton et al. (81) untersuchten die konvulsive Wirkung von Hydraziden im Hinblick auf die regionalen Änderungen der cerebralen GABA- und PLP-Konzentrationen. Es zeigte sich, daß diese Konzentrationsänderungen zwar, wurde das Gesamtgehirn betrachtet, die erwarteten fallenden Tendenzen zeigten, aber in einzelnen Regionen sehr unterschiedlich waren. Beispielsweise stieg der PLP-Gehalt nach Isoniazid im Striatum um 7 %, fiel jedoch im Brücken-Medulla-Bereich um 33 %. Die Autoren schlossen daraus, daß differierende Raten regionaler GABA-Synthese und PLP-Verfügbarkeit mit unterschiedlichen Krampfmustern nach PLP-Antagonisten in Verbindung gebracht werden könnten, was die Bedeutung der Gleichgewichtskonzentration von PLP im Gehirn unterstreicht.

Auch andere Konvulsiva beeinflussen die PLP-Konzentration im Gehirn. Hammad et al. (73) zeigten, daß die Wirkung dieser Substanzen auf die Pyridoxalkinaseaktivität und den PLP-Gehalt in verschiedenen Gehirnregionen nicht gleichförmig war. So erhöhte Picrotoxin, ein postsynaptischer GABA-Antagonist, die PLP-Konzentration im Hippocampus um ca. 11 %, senkte sie aber im Kortex um etwa 13 %.

Strychnin erhöhte die PLP-Konzentration im Kortex um 29 % und senkte sie im Cerebellum um 9 %.

Da keines der getesteten Konvulsiva die Pyridoxalkinaseaktivität signifikant veränderte, waren Hammad et al. der Ansicht, daß die Schwankungen der PLP-Konzentration sekundär zu den von den Konvulsiva hervorgerufenen krampfartigen metabolischen Störungen erfolgen.

7.1.3.3

GABA-Transportsysteme und Vitamin B-6

Wie für andere Neurotransmitter, existieren auch für GABA spezifische Transportsysteme, die einen Nettotransport nach intrazellulär sicherstellen sollen. Es gibt zwei Arten von Systemen für GABA: Solche mit hoher, und andere mit niedriger Affinität. Transportsysteme mit hoher Affinität dienen meist dazu, Wirkungen von Neurotransmittern durch raschen Abtransport aus dem synaptischen Spalt zu beenden. Befunde, die dieses Modell in Bezug auf GABA unterstützen, sind, daß die GABA-Konzentration extrazellulär sehr gering ist (56), und daß GABA-Transaminase extrazellulär nicht auftritt, daß heißt keine Wirkungsunterbrechung von GABA auf enzymatischem Wege im synaptischen Spalt erfolgen kann. Während für viele Transmitter die schnelle Aufnahme in Neuronen erfolgt, scheinen im Falle von GABA offensichtlich auch Gliazellen an der Sicherung niedriger extrazellulärer Spiegel beteiligt zu sein (100).

Ein Inhibitor des zellulären Transports von GABA mit komplexen Eigenschaften ist Aminoöxyacetat (AOAA). Diese Substanz erhöht in geringen Konzentrationen (10^{-6} - 10^{-5} M) die Aufnahme von radiativ markiertem GABA in Gewebe wie z.B. die Retina (110). Da AOAA auch die GABA-T hemmt, vermutete man eher eine Erhöhung des intrazellulären GABA-Gehalts durch Hemmung des Abbaus von GABA, und damit eine nur scheinbare Erhöhung der Aufnahme. Snodgrass et al. (145) konnten jedoch zeigen, daß AOAA in hohen Konzentrationen ($2 - 6 \times 10^{-3}$ M) die Aufnahme von ^3H -GABA in Dünnschnitte von Rattengehirnen inhibierte. Diese Hemmung konnte nun keinem Effekt auf die GABA-T zugeschrieben werden, da diese schon bei weit geringeren Konzentrationen vollständig blockiert war, und trotzdem keine Hemmung der GABA-Aufnahme in Gehirnschnitten auftrat.

Die Hemmung war abhängig von der Dauer der Inkubation der Hirnschnitte mit AOAA und der Konzentration dieser Substanz. Wurde AOAA und ^3H -GABA gleichzeitig ins Inkubationsmedium gegeben, trat keine Hemmung auf. Außerdem bestanden Unterschiede in der Reaktion von Dünnschnitten aus verschiedenen Gehirnregionen.

Es konnte gezeigt werden, daß Pyridoxin die Wirkung von AOAA antagonisierte, sofern es in vitro zu Gehirnschnitten gegeben wurde, die vorher in vivo mit AOAA behandelt worden war. Pyridoxin konnte

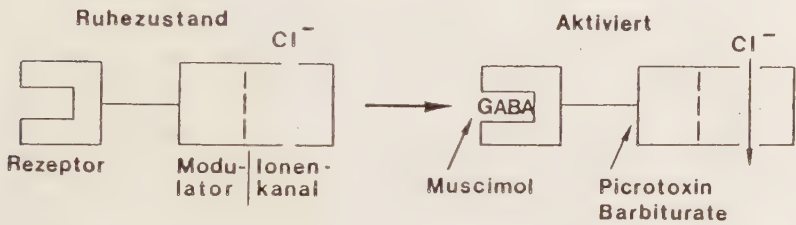
die Wirkung von AOAA nicht aufheben, wenn es gleichzeitig mit dieser Substanz in vivo injiziert wurde. Ebenso erhöhte es nicht die ^3H -GABA-Aufnahme von unbehandelten Gehirnschnitten, im Gegensatz zu PLP, das die ^3H -GABA-Aufnahme signifikant steigerte. Pyridoxal und Pyridoxamin hatten keinen Einfluß auf den Transport.

In der Gegenprobe wurde gezeigt, daß Desoxypyridoxin sowohl in vivo als auch in vitro die ^3H -GABA-Aufnahme von Gehirnschnitten hemmte. Die Autoren nahmen aufgrund dieser Befunde an, daß der GABA-Transport in Nervenzellen ein von PLP abhängiger Prozeß sein könnte, und die Wirkungen von AOAA auf diesen Transport durch Verminderung der PLP-Konzentration im Gehirn zustandekämen. Für diese Vermutung sprechen Untersuchungen, die eine Hemmung der Pyridoxalkinase durch AOAA aufzeigten (45). Außerdem wurde eine antagonistische Wirkung von Pyridoxin auf toxische Effekte der AOAA in Küken beschrieben (112).

Johnston et al. (86) wiesen nach, daß AOAA nicht nur auf den GABA-Transport wirkt, sondern ein relativ unspezifischer Inhibitor des Aminosäuretransports im Gehirn ist. Dies würde die oben genannten Zusammenhänge mit PLP-Wirkungen nicht entkräften, da z.B. Christensen 1972 einen ebenfalls unspezifischen Effekt von PLP auf den Aminosäuretransport von Ehrlich' Asziteszellen gefunden hatte (33). Er vermutete allerdings später auch eine indirekte Beeinflussung der Aufnahme durch Hemmung des Ausstroms von Aminosäuren aus den Zellen (33).

7.1.3.4 GABA-Rezeptorinteraktionen und Vitamin B-6

Das morphologische Korrelat der GABA-Wirkung an der postsynaptischen Membran ist ein Komplex aus einem Rezeptorprotein und einer funktionellen Komponente, die aus einer Modulatorstruktur und einem nachgeschalteten Ionenkanal besteht und die eigentliche die Membranpermeabilität regulierende Stelle ist. Im aktivierten Zustand wird der Ionenkanal geöffnet und Cl^- strömt nach intrazellulär, was zur Hyperpolarisation führt (111).



umgezeichnet nach Olsen et al. (111) .

Substanzen, die die inhibitorische GABA-Wirkung auf der Ebene der postsynaptischen Membran beeinflussen, wirken entweder durch Bindung an den Membranrezeptor oder die Modulatorstruktur. Bei diesen Substanzen läßt sich ihre GABA-agonistische oder antagonistische Wirkung nicht vorhersagen, da diese lediglich davon abhängt, ob sie den aktivierten oder inaktivierten Zustand des Ionenkanals auslösen. Barbiturate z.B. können exzitatorisch oder depressiv wirken.

Die Besprechung dieser postsynaptisch wirksamen Substanzen scheint innerhalb einer Betrachtung der Wechselwirkungen zwischen PLP und GABA auf den ersten Blick von geringem Belang zu sein, neuere Arbeiten haben jedoch gezeigt, daß auch PLP unter bestimmten Bedingungen auf dieser Ebene wirksam sein kann.

Ein spezifischer GABA-Agonist an der postsynaptischen Membran ist Muscimol. Es bindet an die GABA-Rezeptoren und ist wirkungsvoller als GABA selbst.

Picrotoxin wirkt an der nachgeschalteten Modulatorstelle als Antagonist, das heißt dieses Konvulsivum verhindert nicht die Bindung von GABA an seine Rezeptoren, aber dessen Wirkung auf die Cl^- -Permeabilität. Ausdruck dafür ist, daß GABA-T-Hemmer, die die GABA-Konzentration erhöhen, die Wirkung von Picrotoxin nicht aufheben können (127).

Ein Analoges von Picrotoxin, Dihydropicrotoxinin (DHP), dient als Marker der Modulatorstelle und damit als Bezugssystem für andere Substanzen, die an dieser postsynaptischen Struktur kompetitiv zu DHP wirken, wie z.B. die Barbiturate oder Diphenylhydantoin (111).

Aufbauend auf diesem Modell lassen sich nun spezielle Wechselwirkungen zwischen einigen Substanzen und PLP sowie deren klinische Auswirkungen näher erläutern. Darunter sind z.B.

Homocysteinkrämpfe

Bei Patienten mit Homocystinurie sind eine Vielzahl von neurologischen Störungen bekannt, darunter auch Krampfanfälle. In Tierversuchen und Versuchen an Präparationen von synaptischen Membranen wurden Mechanismen der Homocystein-induzierten Krämpfe erhellt. L-Homocystein inhibiert, ähnlich wie die Hydrazide, die GAD und GABA-T. Es bildet mit PLP einen stabilen Homocystein-PLP-thiazin-komplex und könnte durch eine eventuelle PLP-Verarmung zu GABA-Mangel im Gehirn führen. Ein Versuch der Steigerung der Enzymaktivität von GAD durch Vitamin B-6-Gaben schien also therapeutisch vielversprechend (62).

Hurd et al. führten an Mäusen entsprechende Untersuchungen durch (84). Intraperitoneale Injektion rief dosisabhängig Krämpfe hervor, die bei 18 % der Mäuse letal endeten. Wurde mit i.p. Pyridoxin oder PLP in pharmakologischen Dosen vorbehandelt, so stiegen unerwarteterweise die Incidenz von Krampfanfällen und deren Schweregrad an (45 % letal endend), die Latenzzeit bis zum Symptombeginn sank signifikant ab. Vorbehandlung mit dem B-6-Antagonisten Hydrazinsulfat verhinderte bei den Tieren die tonische Komponente der Krampfanfälle völlig und verlängerte die Latenzzeit bis zum Auftreten der klonischen Äquivalente. Generell wurde der Schweregrad der Krämpfe her-

abgesetzt (0 % letal endend). Dies steht in starkem Kontrast zu der Tatsache, daß Hydrazide normalerweise als Konvulsiva wirken. Hurd et al. vermuteten deswegen eine Interaktion zwischen Homocystein und PLP, die krampfauslösend wirkt und die durch Komplexbildung von Hydrazin mit PLP verhindert wird. Ihre Befunde, die einen Mangel an GABA oder Vitamin B-6 als Ursache der Krämpfe unwahrscheinlich machten, wurden von Dewhurst et al. (47) unterstützt, die zeigten, daß hochdosierte Homocysteingabe keine Änderungen des PLP-oder GABA-Spiegels im Gehirn hervorrief.

Griffiths et al. (64) untersuchten eine andere mögliche Ursache der Homocystein-induzierten Krämpfe. Sie betrachteten den Einfluß von Homocystein und PLP auf die Muscimol-Bindung an GABA-Rezeptoren in Präparationen von synaptischen Membranen und konnten zeigen, daß Homocystein und PLP synergistisch die Muscimolbindung hemmen, jedoch die Applikation des Homocystein-PLP-thiazinkomplexes wirkungslos blieb. Jeder der beiden Synergisten blockierte auch allein Muscimolrezeptoren, jedoch nicht in dem Maße wie beide zusammen. Es wurde gezeigt, daß PLP ein rein kompetitiver Inhibitor der Muscimolbindung ist.

Zwar waren sowohl Homocystein als auch PLP in diesen in vitro-Ver suchen erst im millimolaren Bereich, also weit über physiologischen Konzentrationen, wirksam, Griffiths et al. wiesen aber darauf hin, daß die Tatsache des Synergismus zwischen den beiden Substanzen eine physiologische Bedeutung nahelegt. Außerdem sahen sie bei intracerebroventrikulärer Injektion von jeweils subkonvulsiven Dosen von Homocystein und PLP bei Versuchstieren nach 2 - 3 Minuten tonisch-klonische Krampfanfälle.

Unter Hinzunahme von Befunden wie z.B. denen von Dewhurst et al., die bei i.p.-Gabe von konvulsiven Dosen von Homocystein kein Absinken des cerebralen PLP-Spiegels fanden, vermuteten Griffiths et al. eher eine postsynaptische Wirkung von PLP und Homocystein als Ursache der Homocysteinkrämpfe als eine Störung der PLP-Gleichgewichtskonzentration im Gehirn.

7.1.3.5 Modelle für eine epileptogene Wirkung von PLP

In der neueren Literatur gibt es mehrere Untersuchungen zum Thema der konvulsigenen Wirkung von Vitamin B-6.

Kouyoumdjian und Ebadi (88) untersuchten die Wirkung von intracerebroventrikulär injiziertem PLP genauer und fanden, daß bei Ratten die Injektion von 0,125 μmol nach einer Latenz von 4 Minuten tonisch-klonische Krampfanfälle hervorrief, die ca. 5 Minuten lang dauerten. Die Wirkung war dosisabhängig. Gabe von Pyridoxal war, auch in hohen Dosen, von schwächerer Wirkung als diejenige von PLP. Andere Vitamin B-6-Metaboliten waren wirkungslos, ebenso die Antivitamine Desoxypyridoxin und Desoxypyridoxinphosphat.

Die PLP-induzierten Krämpfe kamen ohne Veränderung der GABA-T- oder der GAD-Aktivität zustande. Das beobachtete Absinken der Aktivitäten dieser Enzyme nach den Krampfanfällen wurde als sekundärer Effekt gewertet, hervorgerufen durch die nicht-kompetitive Hemmung der Pyridoxalkinase durch die hohen künstlich herbeigeführten PLP-Spiegel.

Den möglichen Mechanismus dieser PLP-Wirkung sahen die Autoren durch folgende Befunde eingegrenzt :

1. Die Phosphatgruppe ist nicht der für diese Wirkung entscheidende strukturelle Bestandteil von PLP, da andere phosphatierte B-6-Metabolite schwache oder gar keine Wirkung zeigten.
2. Die Vorbehandlung der Ratten mit GABA intracerebroventrikulär verhütete die PLP-induzierten Krampfanfälle, nachträgliche GABA-Applikation unterbrach sie.
3. Muscimol, der GABA-Agonist an der postsynaptischen Membran, zeigte gleiche Wirkung wie GABA, allerdings bei weit geringeren Konzentrationen, was dessen höherer Potenz entspricht.
4. Ein Hemmstoff des neuronalen hochaffinen Transportsystems für GABA, die 2,4-diaminobuttersäure (DABA), war ebenfalls in der Lage, die PLP-Wirkung zu unterbrechen.

Andererseits war diese Blockierung der PLP-induzierten Krämpfe nicht zu sehen bei Anwendung von β -Alanin, einem Hemmstoff des glialen (niedrig affinen) Aufnahmesystems für GABA.

5. PLP-Derivate, die keine freie Aldehydgruppe besitzen
(Isoquinoline) riefen keine Krampfanfälle hervor.

Kouyoumdjian und Ebadi vermuteten aufgrund dieser Befunde, daß die PLP-Wirkung an GABA-ergischen neuronalen Rezeptoren stattfindet, wahrscheinlich durch Bildung von Schiff-Basen zwischen PLP und einem Aminosäurenrest der membranständigen Rezeptorstruktur, mit daraus folgender Inhibition der Bindung von GABA an dessen Rezeptor.

Ebadi et al. (48) hatten gezeigt, daß in vitro eine Hemmung der GABA-Bindung an synaptische Membranen spezifisch durch PLP und Pyridoxal möglich war, allerdings erst bei pharmakologischen Dosen dieser Metaboliten.

Weitere Aspekte solcher nicht-coenzymatischen Wirkungen von PLP, die auf seine mögliche epileptogene Bedeutung auch unter physiologischen Verhältnissen hinwiesen, beleuchteten neuerdings Chung et al. (34, 35).

Zum Verständnis sei zweierlei vorausgeschickt:

1. Chung et al. arbeiteten mit Mäusen, die genetisch empfänglich sind für akustisch ausgelöste Krämpfe (DBA/2J-Mäuse). Diese sogenannten audiogenen Krämpfe dienen schon lange als Epilepsiemodell, sie treten auch bei anderen Spezies als Mäusen auf. Es fanden sich viele Coinzidenzen zwischen der Prädisposition zu akustisch induzierten Krämpfen und anderen neuropathologischen Befunden, beispielsweise, mit Bezug zum Vitamin B-6-Stoffwechsel: (128)
 - a) Bei DBA/2J-Mäusen findet man signifikant erhöhte Suszeptibilität für audiogene Krämpfe, wenn sie Pyridoxindefizient ernährt werden. Bei Mäusen anderen Genotyps ist der Unterschied nicht so ausgeprägt.
 - b) Erhöhung des GABA-Spiegels im Gehirn von DBA/2J-Mäusen durch Behandlung mit Aminoxyacetat (GABA-Transaminasehemmer) senkt die Anfälligkeit für audiogene Krämpfe.
 - c) Es konnten andererseits keine Unterschiede im GABA-Gehalt des Gehirns von Mäusen mit und ohne Krampfempfindlichkeit festgestellt werden. Ebenso waren die Aktivitäten von GAD nicht unterschiedlich (128).

2. Intensiv erforscht wurden mögliche regulierende Einflüsse von Zink-Ionen auf die Aktivitäten von Pyridoxalkinase und Glutamat-decarboxylase. McCormick et al. zeigten 1961, daß die Pyridoxalkinase von zweiwertigen Kationen stimuliert wird, am intensivsten durch Zink-Ionen (105). Wu et al., die 1973 die Glutamat-Decarboxylase isolierten, fanden bei kinetischen Studien, daß das Enzym durch Zink-Ionen in seiner Aktivität gehemmt wird (174).

Ebadi et al., die in vivo-Versuche an Ratten durchführten, fanden diese Aussage bestätigt und vermuteten, daß Zink-Ionen als Regulator in der PLP-abhängigen GABA-Synthese dienen könnten (50).

Die Bedeutung der Spurenelemente Zink und Kupfer für das ZNS erhellt z.B. aus der Beobachtung, daß bei deren Abwesenheit Fehlbildungen des ZNS und Demyelinisierung auftreten.

Vor diesem Hintergrund seien nun die Untersuchungen von Chung et al. betrachtet. Sie fanden, daß das Gehirn von Mäusen, die empfindlich für akustisch ausgelöste Krämpfe sind, 24 % mehr PLP enthält als dasjenige von Kontrolltieren, außerdem auch signifikant höhere Konzentrationen an Zink und Kupfer.

Wurde normalen Mäusen intracerebral 400 ng $ZnCl_2$ appliziert und nach einigen Stunden 1 mg PLP intraperitoneal injiziert, so waren sie nach 30 Minuten genauso anfällig für Krämpfe nach lauter Beschallung wie die DBA/2J-Mäuse. Dies war nicht der Fall bei alleiniger PLP- oder $ZnCl_2$ -Gabe. Bei normalen Mäusen konnten eine Stunde nach intraperitonealer Injektion von 1 mg PLP um 30 - 40 % erhöhte ZNS-Spiegel von PLP gemessen werden, die nach 4 Stunden wieder normalisiert waren. Gleichzeitig mit dem Ansteigen der PLP-Konzentration im Gehirn sank die GABA-Konzentration stark ab. Es zeigte sich aber, daß die Mäuse, die nur PLP bekommen hatten, trotz ihres extrem niedrigen GABA-Spiegels nicht so krampfanfällig wurden wie diejenigen, die gleichzeitig Zinkchlorid und PLP bekommen hatten. Bei letzteren war der GABA-Spiegel nicht so niedrig wie bei den nur mit PLP behandelten Mäusen. Diese Befunde korrelieren mit den Aussagen von Kouyoumdjian et al., die die GAD-Aktivität im Gehirn nach intracerebroventrikulärer Gabe von PLP erniedrigt fanden (88).

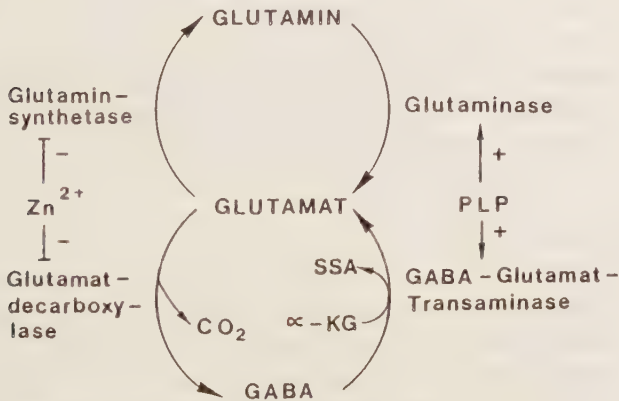
Chung et al. verbanden diese Befunde zu folgender Hypothese, deren zentraler Punkt der exzitatorische Transmitter und GABA-Vorläufer Glutamat ist. (Siehe Abb. 25).

Für Glutamat existieren im ZNS 2 relevante Wege des Katabolismus: Derjenige der Reaminierung zu Glutamin durch Glutaminsynthetase und derjenige der Decarboxylierung zu GABA durch Glutamatdecarboxylase.

Ebenfalls 2 Stoffwechselwege sorgen für die Synthese von Glutamat: Neben der GABA-glutamat-transaminase (GABA-T) noch die Glutaminase, die Glutamin katabolisiert.

Die Glutamat-katabolisierenden Enzyme sind beide durch Zink-Ionen hemmbar, die beiden Glutamat-synthetisierenden Enzyme durch PLP aktivierbar.

Abb. 25 :



umgezeichnet nach Chung und Johnson , (35).

Das heißt, daß bei hohen Spiegeln von Zink und PLP im ZNS eine Verschiebung der Gleichgewichte dieser enzymatischen Reaktionen in Richtung Glutamat auftreten kann. Das heißt gleichzeitig, daß GABA durch die Zink-induzierte Hemmung von GAD und die PLP-induzierte Aktivierung von GABA-T vermindert wird. Als Nettoeffekt müßte man dann eine Steigerung der Erregbarkeit des ZNS erwarten.

Im Zusammenhang hiermit erscheinen Kinetikstudien der GAD interes-

sant, die zeigten, daß 2 Typen von GAD-Aktivität im ZNS vorliegen: Ein Typ ist von der freien PLP-Konzentration abhängig, er kann durch eine nicht enzymatisch gebildete Glutamat-PLP-Schiffbase gehemmt werden, die unter Umständen bei hohen PLP- und Glutamat-Konzentration auftritt. Ein anderer Teil der GAD-Aktivität ist unabhängig von der Konzentration an freiem PLP, sorgt also immer für eine Mindestmenge an GABA. Dieses von Bayon et al. (12) vorgeschlagene System entspräche einem Kontrollmechanismus für GAD, der über die Konzentration von PLP und Glutamat und anderer Aminosäuren (möglicherweise auch GABA) funktioniert.

Auch in diesen Arbeiten findet man Anhaltspunkte für die von Griffiths et al. entworfene Hypothese, daß das Auftreten leichter Erhöhungen von mehreren neurotrophen Substanzen synergistisch zu Wirkungen führen kann, die durch alleinige Konzentrationszunahme einer Substanz nicht zu erreichen sind (64).

Im Falle von PLP könnte es etwa bei pathologischen Zuständen, wenn sich Substanzen in erhöhten Konzentrationen ansammeln, durch Bildung von Komplexen mit PLP, die wegen der Reaktionsfreudigkeit der aktiven Gruppe von PLP unschwer entstehen können, zu Wirkungen auf verschiedenen Ebenen des Neurotransmitterstoffwechsels kommen.

Bei den meisten hier geschilderten Vorgängen bleibt noch unklar, inwieweit sie die Gegebenheiten in vivo beschreiben. Es gibt aber Hinweise darauf, daß Vitamin B-6 beim Menschen und in physiologischen Dosen andere als antikonvulsive Wirkungen entfaltet.

Beispielsweise zeigte sich bei der Behandlung von Kindern mit Krampfleiden, daß in einer bestimmten Zahl von Fällen sowohl klinisch als auch im EEG eine Verschiebung zu vermehrter Krampfaktivität nach Behandlung mit Vitamin B-6 auftrat (82).

Coursin erwähnte im Zusammenhang mit Neuropathien und Krampfanfällen während der Tuberkulosebehandlung mit Hydraziden, daß es nach hochdosierter Pyridoxingabe, die zur Therapie solcher Störungen dient, zur Auslösung von "Krisen von Krampfanfällen" kommen könne (40). Die Senkung der Schwelle für INH-induzierte Krämpfe durch Vitamin B-6-Gabe wurde auch experimentell erwiesen (39).

7.2 Aufgabenstellung

Die beeindruckende Komplexität der bekannten Wirkungen des Vitamin B₆ im ZNS, das Faktum, daß Konzentrationsveränderungen von neurotrophen Substanzen für die Entfaltung von Wirkungen entscheidender sind als absolute Konzentrationen und die Bedeutung der Kompartimentierung im ZNS lassen Messungen der Konzentration von PLP im Liquor als übersimplifizierend erscheinen. Es gibt jedoch Anhaltspunkte dafür, daß solche Bestimmungen unter klinischen Gesichtspunkten von Interesse sein können.

Beispielsweise wurden Veränderungen des Liquor-GABA-Spiegels bei Epilepsien und anderen neurologischen Erkrankungen festgestellt (129). Der enge Zusammenhang zwischen PLP und GABA im ZNS läßt daher auch Liquor-PLP-Messungen in diesem Zusammenhang interessant erscheinen.

Die Frage, ob der Liquorspiegel von Vitamin B₆ den neurologischen Status bei Erkrankungen des ZNS widerspiegelt, konnte bei Alkoholikern positiv beantwortet werden. Patienten mit mentalen Veränderungen und peripherer Neuropathie zeigten signifikant niedrigere Liquorspiegel als solche, die nur an einer peripheren Neuropathie litten. Letztere wiederum wiesen signifikant kleinere Liquorkonzentrationen auf als Kontrollpersonen (44).

Da die Liquorpunktion eine diagnostische Routinemethode bei febrilen Erkrankungen von Säuglingen und auch bei unklaren Krampfanfällen ist, erscheint es interessant, festzustellen, ob die Messung des Liquor-PLP-Gehalts die Möglichkeit bietet, die cerebrale Vitamin B₆-Versorgung einzuschätzen oder Verbindungen zwischen bestimmten Erkrankungen des ZNS und Veränderungen des Liquor-PLP-Spiegels zu erkennen. Für eine solche Überprüfung der Eignung des Liquor-PLP-Gehalts als diagnostischer Parameter sollten Grundlagen geschaffen werden anhand der

- a) Erfassung von Normalwerten des Liquor-PLP-Gehalts
- b) Untersuchung des Einflusses des Liquorproteingehalts und des Serum-PLP-Gehalts auf die Liquor-PLP-Konzentration
- c) Messung der Liquor-PLP-Konzentrationen bei Erkrankungen des ZNS und bestimmten neurologischen Symptomen mit besonderer Berücksichtigung von Krampfleiden.

7.2.1 Definition von Normalwerten

Bei dieser Untersuchung von Meßdaten im Liquor cerebrospinalis erscheint die Definition von Normalwerten problematisch. Da für die Gewinnung des Untersuchungsmaterials eine Indikation in Form einer neurologischen Symptomatik oder eines begründeten Verdachts auf eine Erkrankung des ZNS bestehen muß, gibt es im Grunde keine Normalwerte bei einer solchen Studie. In der Praxis muß so vorgegangen werden, daß man aufgrund anderer Parameter des Liquors, die einen pathologischen Zustand anzeigen, wie z.B. der Liquorproteinkonzentration auf das Vorliegen eines normalen oder pathologischen Liquors schließt.

In dieser Studie wurden Normalwerte in Bezug auf Liquor-PLP dann angenommen, wenn sich bei den Routinelaborbestimmungen wie Protein, Chlorid und Glucose keine pathologischen Bilder ergaben und wenn keine Krampfsymptomatik vorlag.

7.3. Material

Liquorproben erhielten wir vom Labor für klinische Chemie der Hauner'schen Kinderklinik und von Häusern, die Proben direkt an das Stoffwechsellabor sandten. An dieser Stelle sei allen Mitarbeitern der Institute gedankt, die unser Projekt durch die Überlassung von Liquorproben und die Möglichkeit zur Einsichtnahme in Krankenakten unterstützten.

7.3.1 Stabilität von PLP in Liquorproben

Da bei Lumbalpunktionen bei Neugeborenen oder Säuglingen nur geringe Mengen an Liquor zu gewinnen sind, mußte sichergestellt sein, daß für die vorrangigen diagnostischen Untersuchungen genügend Material vorhanden war. Das heißt, es konnte die für die PLP-Messung notwendige Menge Liquor erst erhalten werden, wenn alle anderen Tests durchgeführt waren. Die Proben waren also während der Dauer der Verarbeitung im klinisch-chemischen Labor dem Licht ausgesetzt, wurden dann eingefroren und nach dem Wiederauftauen sofort der PLP-Spiegel bestimmt.

Unter dieser Voraussetzung sind die Versuche zur Stabilität von PLP im Liquor zu bewerten. Die Abb. 26 und 27 zeigen den Konzentrationsverlauf von PLP in Aliquoten von 2 Liquorproben (einer mit hohem, einer mit niedrigem PLP-Gehalt), die unter verschiedenen Bedingungen aufbewahrt wurden.

In den bei normalem Tageslicht aufbewahrten Proben waren bereits nach 24 Stunden 80 % des PLP inaktiviert. Das entsprach etwa der Stabilität von PLP in physiologischer Kochsalzlösung. Die Halbwertszeit von PLP im Blutplasma war etwas größer.

Jeweils 2 weitere Probenreihen der beiden Liquores wurden unter völligem Lichtabschluß aufbewahrt, eine bei 4° C, die andere bei Raumtemperatur.

Es zeigte sich, daß in den Probenreihen aus dem Liquor mit hohem PLP-Gehalt (1) die Konzentration weit schneller absank als in dem Liquor mit geringem PLP-Gehalt (2).

Nach 2 Tagen waren in Liquor 1, bei 4° C aufbewahrt, nur noch 70 % der Ausgangskonzentration vorhanden, in den bei 20° C aufbewahrten Proben noch 25 %.

Im Liquor 2 konnte nach 2 Tagen bei 4° C kein Konzentrationsverlust festgestellt werden, bei 20° C waren noch 60 % des Ausgangsgehalts nachweisbar.

Da bei diesen Proben die Photolyse wohl kaum eine Rolle spielte, muß man hier die Einflüsse anderer Liquorbestandteile in Rechnung stellen, wie z.B. von Enzymaktivitäten (alkalische Phosphatase), die bei infektiösen und vaskulären Erkrankungen des ZNS teilweise unspezifisch zunehmen und zu einem schnelleren Abbau von PLP beitragen können.

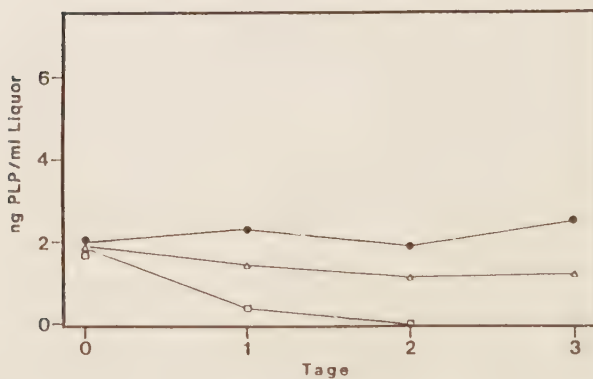
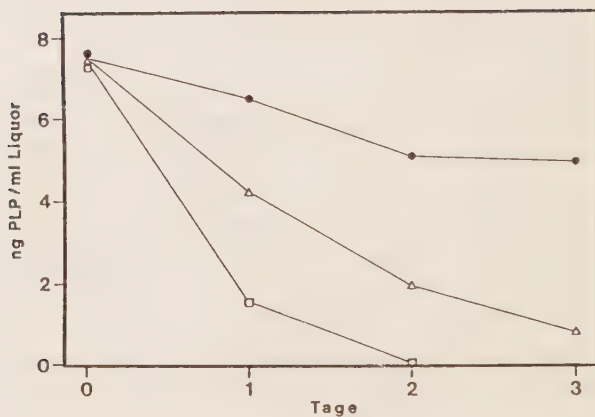


Abb. 26 u. 27 : Stabilität von PLP im Liquor cerebrospinalis

(—●—): Aufbewahrung bei 4°C im Dunkeln

(—△—): Aufbewahrung bei Raumtemperatur im Dunkeln

(—□—): Aufbewahrung bei Raumtemperatur im Tageslicht

7.4 Methoden

Vor der Analyse wurden die Liquorproben gründlich geschüttelt und dann feste Bestandteile abzentrifugiert.

Es erfolgte lediglich eine Verdünnung des Liquor mit 0,2 M NaAc-Puffer, pH 5,5, im Verhältnis 1:30.

150 µl dieser Verdünnung wurden im Analysenansatz verwendet. Die Analyse verlief wie unter 4. 5. beschrieben.

Eine Deproteinisierung von Liquorproben erwies sich als nicht notwendig. Der Vergleich von Aliquoten derselben Probe, die mit und ohne Deproteinisierung verarbeitet wurden, ergab, daß die Meßwerte von enteiweißten Proben durchschnittlich 10 % unter denjenigen von nicht enteiweißten lagen, auch bei stark xanthochromen und proteinreichen Liquores. Eine mögliche Erklärung ist die Senkung der Zählrate des Tests bei Anwesenheit von PCA und KOH (siehe Abb. 20 , Seite 55), die etwa 10 % niedriger als die Zählrate in NaAc-Puffer liegt.

Einfluß der Säurepräzipitation von Proteinen mit Perchlorsäure auf die PLP-Konzentration in Liquorproben :

n	PLP (ng/ml)		Quotient	ohne PCA	
	mit PCA	ohne PCA		mit PCA	
18	3,3 ± 2,2 (0,9 - 7,4)	3,7 ± 2,3 (0,8 - 8,1)		0,9	

7.5 Ergebnisse

7.5.1 Häufigkeitsverteilung der Meßdaten im Liquor cerebrospinalis

Von der Gesamtzahl der PLP-Meßwerte im Liquor wurden diejenigen ausgeschlossen, die als Ausreißer verdächtig waren. Es wurde hierzu nach der 4-Sigma-Regel vorgegangen. Hierbei werden Werte als Ausreißer verworfen, wenn sie außerhalb des Bereiches $\bar{x} \pm 4 s$ liegen (124). Mittelwert und Standardabweichung werden ohne die ausreißerverdächtigen Werte berechnet:

$$\bar{x} \pm s = 3,77 \pm 2,71 \text{ ng/ml}$$

Der 4-Sigma-Bereich beträgt in diesem Fall also

$$\bar{x} \pm 4 s = 0,0 - 14,6 \text{ ng/ml}$$

Alle Werte über dieser Grenze wurden als Ausreißer ausgeschlossen. Es zeigte sich, daß darunter die Mehrzahl von Kindern mit Hydrocephalus stammte. Da bei einigen unter diesen Patienten Messungen in mehreren Liquorproben durchgeführt worden waren, wurde diese Gruppe ganz ausgeschlossen und gesondert behandelt.

Ebenso wurden die Messungen bei Patienten mit Krampfsymptomatik, gleichgültig welche Diagnose oder Verdachtsdiagnose bestand, gesondert betrachtet.

Es verblieben 136 Meßwerte, deren Summenhäufigkeitsgrafik Abb. 28 zeigt. Wäre diese gesamte Population homogen und normal verteilt, so müßte, da die Ordinate logarithmisch gezeichnet ist, annähernd eine Gerade die Verteilung der Meßwerte beschreiben. Es zeigt sich jedoch deutlich, daß mindestens zwei Populationen in der Gesamtmenge beinhaltet sind, die jeweils normalverteilt erscheinen.

Die Häufigkeitsverteilung (Abb. 29) zeigt zusätzlich die Gewichte der beinhalteten Gruppen. Die stärkere Gruppe besitzt einen Mittelwert um 3 ng/ml, die schwächere hat ihren Mittelwert bei ungefähr 7 ng/ml.

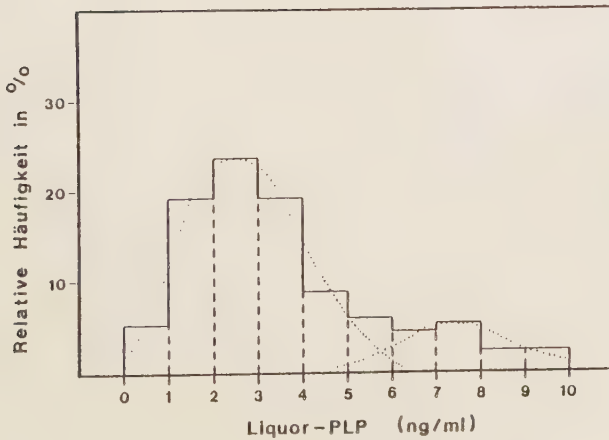
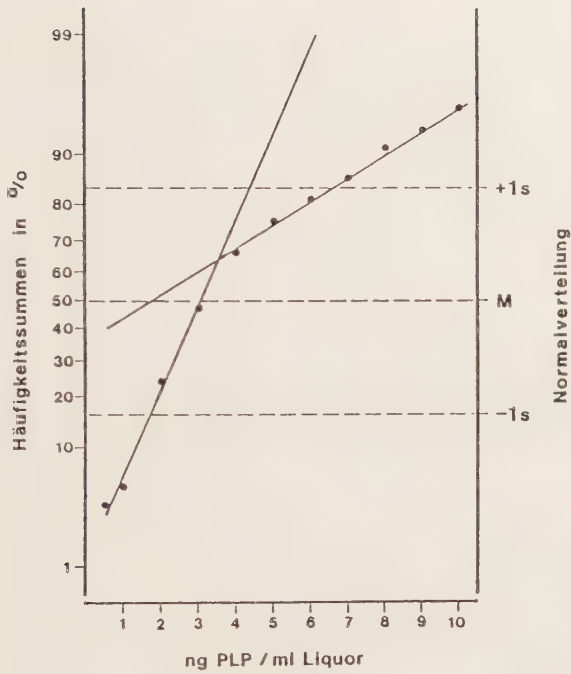


Abb. 28 u. 29 : Prüfung der Verteilung aller Liquor-PLP-Werte auf Normalität mit Hilfe des Wahrscheinlichkeitsnetzes (Abb.28), und Histogramm der gleichen Meßwerte (Abb.29).

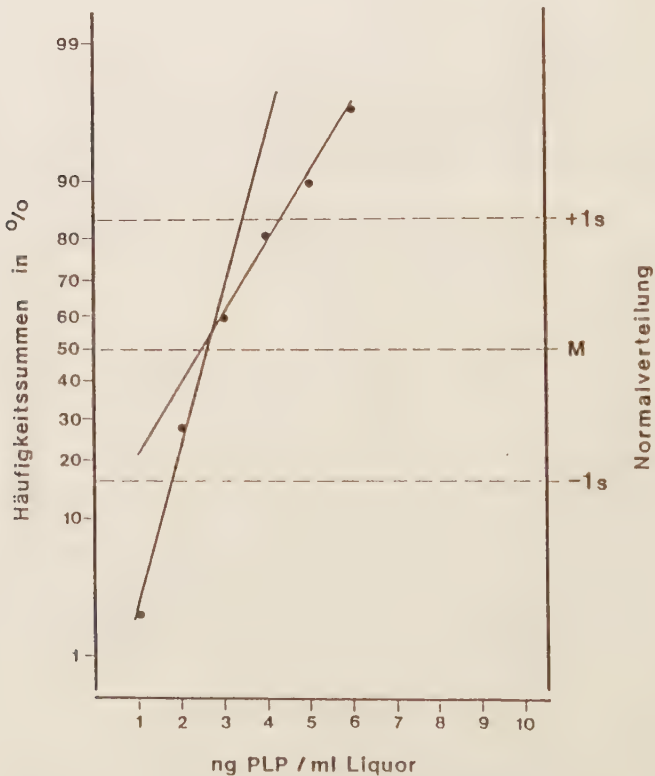
Die Notwendigkeit einer Untergruppenbildung zur Berücksichtigung der Inhomogenität der Gesamtpopulation war damit klar. Aufgrund der Vermutung, daß das Lebensalter die Liquor-PLP-Konzentration beeinflusst, wurden zwei Altersgruppen gebildet:

Gruppe 1: Alter < 1 Jahr

Gruppe 2: Alter ≥ 1 Jahr

Außerdem wurden die Individuen mit erhöhtem Liquorproteinspiegel als Indikator einer Schrankenstörung zu einer gesonderten Gruppe zusammengefaßt.

Die Werte der Altersgruppe 1 und der Patienten mit erhöhtem Liquorproteinspiegel wurden aus der Gesamtmenge ausgeschlossen. Die verbliebenen 88 Werte zeigten folgende Verteilung (Abb.30):



Die sehr hohen Liquor-PLP-Werte waren nun eliminiert, es bestanden aber nach wie vor zwei verschiedene Gruppen, obwohl das Gewicht der Gruppe mit höheren Meßwerten geringer geworden war.

Es war hier noch nicht klar, ob es für die Individuen, deren höherer Liquor-PLP-Gehalt diese Restinhomogenität verursachte, Gemeinsamkeiten gab, die als Ursache für die höheren Liquorwerte angesehen werden konnten.

7.5.2 Korrelation von Liquor-und Plasma-PLP-Gehalt

Trotz dieser Unklarheit wurde von allen Individuen der in Abb. 30 gezeigten Gruppe, bei denen Liquor-und zugehörige Plasmameßwerte vorlagen, deren Korrelation untersucht.

In Abb. 31 ist dieser Zusammenhang graphisch dargestellt. Hier wird auch augenfällig, daß innerhalb der betrachteten Population tatsächlich noch eine Untergruppe besteht. Es sind diejenigen Individuen mit sehr hohen Plasma-PLP-Werten. Bei erneutem Überprüfen der Häufigkeitssummen der Liquormeßwerte nach Weglassen der Liquorwerte dieser Patienten zeigte sich eine annähernd homogene normal verteilte Population (Abb. 32).

Die Berechnung der Regressionsgerade, des Korrelationskoeffizienten und des Erwartungsbereiches erfolgte unter Zugrundelegung dieser Population (Alter ≥ 1 Jahr, normaler Liquorproteingehalt, Plasma-PLP-Gehalt < 30 ng/ml).

Wie aus Abb. 31 ersichtlich ist,beeinflußt extrem hoher Plasma-PLP-Gehalt die Liquor-PLP-Konzentration zwar gleichsinnig, jedoch nicht in dem Maße, wie aus der Regressionsgerade zu erwarten wäre. Fast alle Liquorwerte von Personen mit sehr hohem Plasma-PLP-Spiegel liegen unterhalb des Erwartungsbereiches, der für die homogene Gruppe ohne Plasma-Ausreißer kalkuliert wurde. Dies läßt die Anwendung einer linearen Regression zumindest über eine derart große Spannweite von Meßwerten unzulässig erscheinen. Eine mögliche physiologische Erklärung dieses Sachverhalts wird in der Diskussion erläutert.

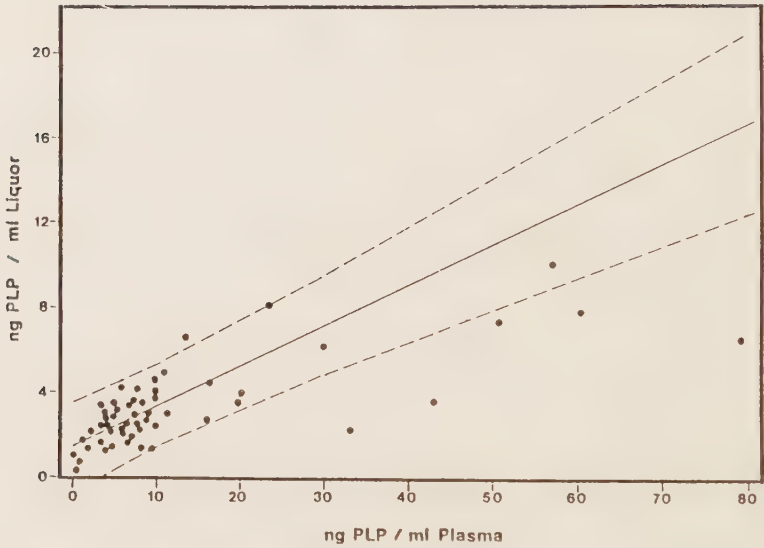


Abb. 31 : Korrelation von Liquor- und Plasma-PLP-Gehalt bei Individuen der Altersgruppe ≥ 1 Jahr (Liquorprotein normal, keine Patienten mit Hydrocephalus oder Krampfsymptomatik)

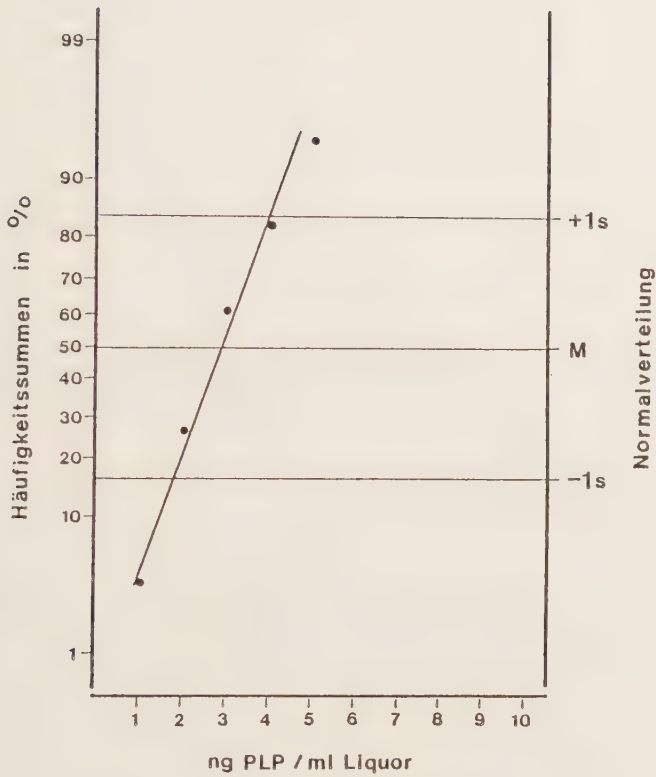


Abb. 32 : Summenhäufigkeitsgraphik der Liquor-PLP-Werte der Individuen der Abb. 30 (Alter $\geq$ 1 Jahr, Liquorprotein normal) nach weglassen der Personen mit sehr hohen Plasma-PLP-Spiegeln.

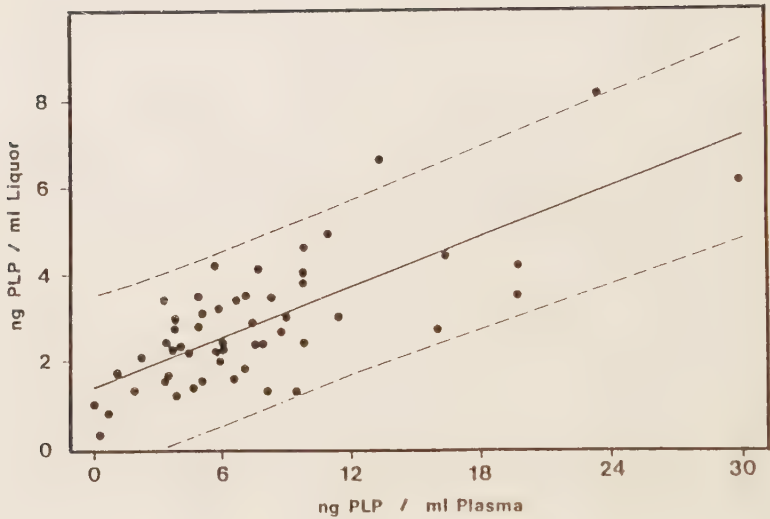


Abb. 33 : Korrelation von Liquor- und Plasma-PLP-Konzentrationen der Individuen, deren Liquor-PLP-Werte normalverteilt sind. (Alter ≥ 1 Jahr, Liquorprotein normal, Plasma-PLP normal, Patienten mit Hydrocephalus oder Krampfanfällen ausgeschlossen)

In Abb. 33 sind die Regressionsgerade und der Erwartungsbereich von Liquor- und Plasma-PLP-Werten ohne die Ausreißer der Plasma-PLP-Werte aufgezeichnet.

Gezeigt ist die Regressionsgerade, die vom Plasmagehalt auf den Liquorgehalt schließt. Ihre Gleichung lautet:

$$y = 0,19 x + 1,40 \quad (n = 52)$$

Der Korrelationskoeffizient beträgt:

$$r = + 0,54$$

Die Prüfung auf das Vorhandensein einer Korrelation erfolgt anhand der Signifikanzschranke der Student-Verteilung.

$$\text{Prüfgröße } \hat{t} = |r| \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}} \quad ; \quad \text{wobei } n = 52, r = 0,54$$

Nullhypothese ist, daß r Unabhängigkeit anzeigt. Die Anzahl der Freiheitsgrade ist 50, da der Stichprobenumfang 52 und die Zahl der aus der Stichprobe geschätzten Parameter 2 beträgt. Da das Vorzeichen des Korrelationskoeffizienten sicher war, wurde der einseitige Test gewählt, die Irrtumswahrscheinlichkeit mit 2,5 % vorgewählt.

Der $\hat{t}$ -Wert errechnet sich dann zu $\hat{t} = 4,169$.

Der Tafelwert $t_{50;0,025}$ beträgt hierfür 2,009.

Da $\hat{t} > t_{50;0,025}$, kann die Nullhypothese mindestens auf dem 2,5 %-Niveau abgelehnt werden. Die Korrelation ist auf diesem Niveau bedeutsam.

Der Voraussagebereich für eine zukünftige Beobachtung y an der Stelle x wurde bestimmt mit

$$\hat{y} \pm t_{(n-2)} s_{\hat{y}}$$

Dabei ist $s_{\hat{y}}$ die Standardabweichung für einen vorausgesagten Einzelwert y an der Stelle x .

$t_{(n-2)}$ ist die Signifikanzschranke der Student-Verteilung.

Der 95 % Vertrauensbereich für eine Schätzung des Wertes y wurde für 5 x -Werte bestimmt, mit $n = 52$; $\bar{x} = 7,4$ ng/ml.

Tabelle 17 gibt die Intervalle der y -Werte für jeden x -Wert und die Grenzwerte an.

Tabelle 17 : 95%-Vertrauensgrenzen für Schätzungen der Liquor-PLP-Konzentration.

Plasma-PLP-Konz. ng/ml	Mittl. Liquor- PLP-Konz.ng/ml	Standard- abweichung	Grenzwerte ng/ml
0	1,4	2,1	0,0 bis 3,5
2	1,8	2,0	0,0 bis 3,8
6	2,5	2,0	0,5 bis 4,5
12	3,7	2,0	1,7 bis 5,7
30	7,1	2,3	4,8 bis 9,4

Die angegebenen Intervalle gelten nur für x -Werte innerhalb des Meßbereiches. Zur Verdeutlichung der Tendenz der Liquor-PLP-Werte bei Individuen mit extrem hohem Plasma-PLP-Spiegel wurde noch das Intervall bei einem x -Wert von 80 ng/ml bestimmt, obwohl derart hohe Plasmawerte aus der Regressionsanalyse weggelassen worden waren.

Plasma- PLP-Konz. ng/ml	Mittl. Liquor- PLP-Konz.ng/ml	Standard- abweichung	Grenzwerte ng/ml
80	16,6	4,2	12,4 bis 20,8

7.5.3 Altersabhängigkeit der Liquor-und Plasmakonzentration von Pyridoxalphosphat

In den Abbildungen 34 und 35 sind die Konzentrationen von PLP im Liquor cerebrospinalis und im Blutplasma dem Alter der Individuen gegenübergestellt.

Für die Annahme einer Altersabhängigkeit der Liquor-PLP-Konzentration gibt es verschiedene Gründe:

- a) es existieren einige Arbeiten, die einen solchen Zusammenhang beim Plasma-PLP-Gehalt aufwiesen.
- b) Auch die in 6.4. gezeigten Untersuchungen der Vollblut-PLP-Konzentrationen verschiedener Altersgruppen zeigen eine mit der Literatur übereinstimmende Tendenz zu fallenden PLP-Werten bei steigendem Alter.
- c) Die in Abb. 33 festgehaltene Korrelation zwischen der Plasma- und Liquor-PLP-Konzentration läßt Rückschlüsse vom Blutgehalt auf den Liquorgehalt möglich erscheinen.
- d) Da die Vermutung naheliegt, daß der Zustand der Blut-Liquor-Schranke die Liquor-PLP-Konzentration beeinflusst, wurden Früh-und Neugeborene, deren Schrankenfunktion noch unreif ist, als gesonderte Altersgruppe betrachtet.

Als konkrete Anhaltspunkte für die Wahl der Grenzen der Altersgruppen wurden die Ergebnisse der Arbeiten von Statz und Felgenhauer verwendet, die die Entwicklung der Blut-Liquor-Schranke für Proteine untersuchten. Bezüglich Albumin fanden sie bei Frühgeborenen des Gestationsalters von 28 Wochen mittlere Konzentrationen von 120 mg/dl, bei Neugeborenen von 40 Wochen Gestationsalter war die Konzentration nur noch ca. 50 mg/dl, um dann bis zur 6. Lebenswoche weiter rasch abzusinken. Die Albuminkonzentration näherte sich dann langsam dem Normalbereich, der ab ca. 1 Jahr Lebensalter erreicht wird. (Siehe auch Abb.37 auf Seite 153).

Entsprechend nimmt der Serum/Liquor-Quotient bis ungefähr zur 6. Lebenswoche rasch zu, erreicht dann ungefähr mit dem 1. Lebensjahr den Erwachsenenwert (156).

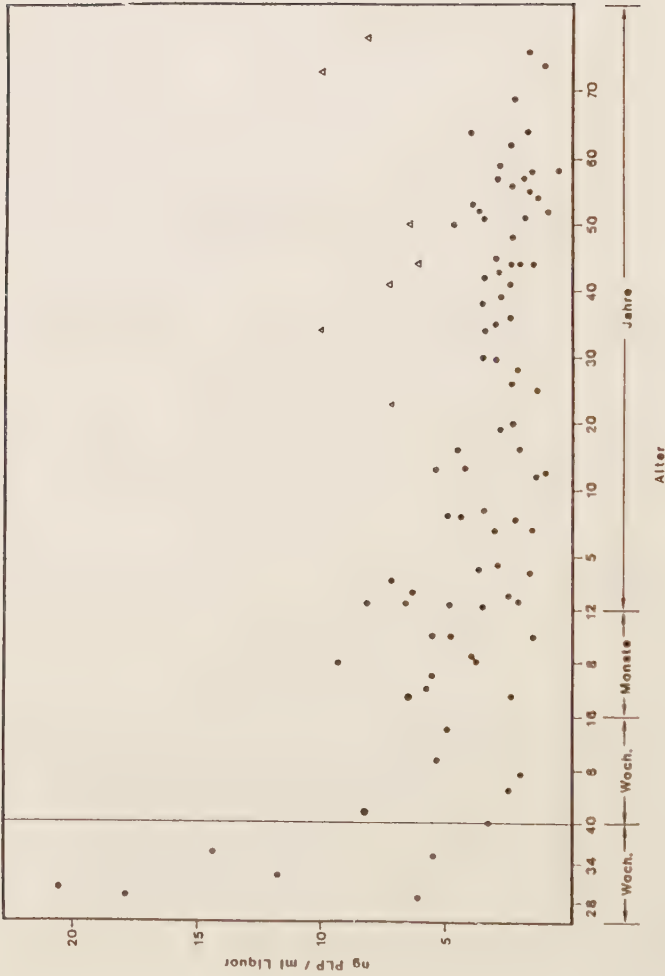


Abb. 34 : Altersabhängigkeit der Liquor-PLP-Konzentration
(●) : Individuen mit sehr hohen Plasma-PLP-Spiegeln
(Δ) : Individuen mit sehr niedrigen Plasma-PLP-Spiegeln

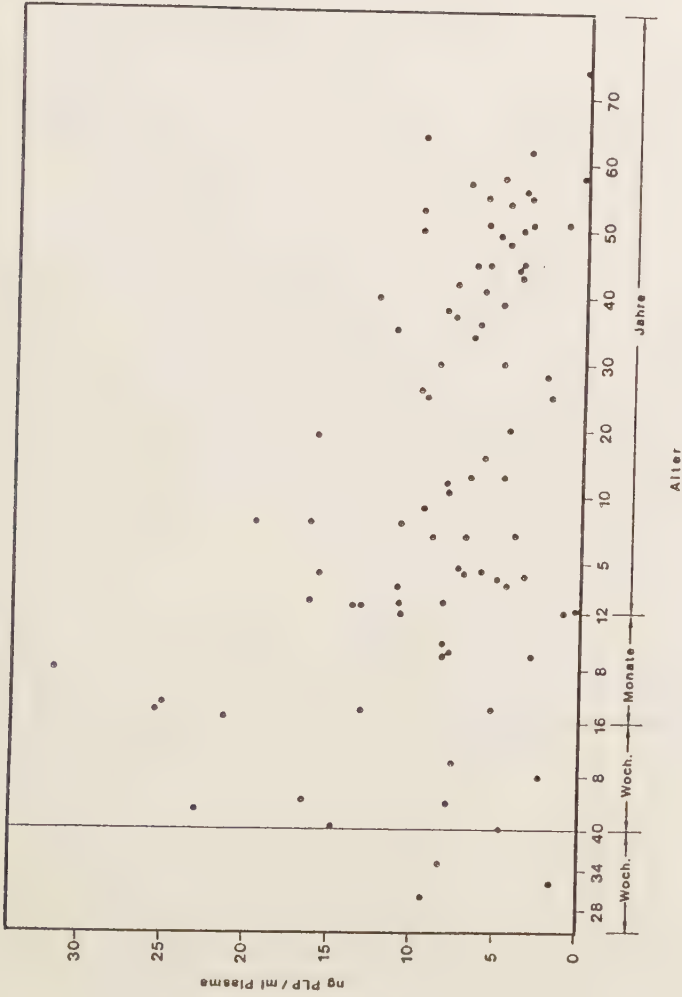


Abb. 35 : Altersabhängigkeit der Plasma-PLP-Konzentration

Es wurden deshalb folgende Altersgruppen getrennt betrachtet:

- a) Frühgeborene-und Neugeborene bis einschließlich der 4. Lebenswoche
- b) Säuglinge bis 1 Jahr Alter (ausschließlich)
- c) alle Individuen älter als 1 Jahr.

Wiederum wurden bei diesen Graphiken Individuen mit Krampfsymptomatik, Hydrocephalus und Meningitis weggelassen. Die hohen Liquorproteinwerte bei Frühgeborenen und einigen Neugeborenen wurden als physiologisch angesehen, wenn retrospektiv betrachtet keine Erkrankung des ZNS vorlag.

Für jede Altersgruppe wurden nun die Regressionsgerade und der Korrelationskoeffizient ermittelt und untereinander verglichen. (Tab. 18a,b) Wegen der geringen Zahl der Meßwerte in Altersgruppe A (Früh-und Neugeborene) und ihrer enormen Streubreite wurde darauf verzichtet, hier Regressionsgerade und Korrelationskoeffizient zu berechnen. Diese Meßwerte wurden jedoch in die Gesamtbetrachtung mit einbezogen.

Die Liquor-PLP-Konzentrationen der Personen mit extrem hohen Plasma-PLP-Werten wurden zwar aus der Berechnung der Korrelation weggelassen, jedoch zur Verdeutlichung des Einflusses der Plasma-PLP-Konzentration auf die Liquor-PLP-Konzentration in die Graphik mit aufgenommen. (Symbol: offene Dreiecke in Abb. 34).

Tabelle 18 a : Abhängigkeit der Liquor-PLP- Konzentration vom Lebensalter

Altersgruppe	Regressionsgleichung	Korrelationskoeffizient	n
a) $x \leq 4$ Woch	-	-	8
b) 4 Woch. $< x < 1$ Jahr	$1,8x + 3,6$	0,05	14
c) $x \geq 1$ Jahr	$-0,03x + 3,9$	-0,21	63
d) Gruppen (a) + (b)	$-0,04x + 4,2$	-0,24	77
e) Gruppen (a)+(b)+(c)	$-0,06x + 5,4$	-0,20	85

Tabelle 18 b : Abhängigkeit der Plasma-PLP- Konzentration vom Lebensalter

Altersgruppe	Regressions- gleichung	Korrelations- koeffizient	n
a) $x \leq 4$ Woch.	-	-	8
b) $4 \text{ Woch.} < x < 1 \text{ Jahr}$	$(-1,10x + 13,8)$	-0,001	12
c) $x \geq 1 \text{ Jahr}$	$-0,08x + 9,3$	-0,16	68
d) Gruppen (a) + (b)	$-0,11x + 10,6$	-0,17	80
e) Gruppen (a)+(b)+(c)	$-0,11x + 10,5$	-0,15	88

Prüfung der Korrelationskoeffizienten auf Signifikanz gegen Null.

Sowohl bei Liquor-als auch Plasma-PLP-Konzentrationen deuten die Regressionsgleichungen eine fallende Tendenz bei steigendem Lebensalter an. Im Folgenden soll überprüft werden, ob der Zusammenhang bedeutsam ist.

Es wird anhand der t-Verteilung geprüft. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wird das 95 % Niveau gewählt. Der zweiseitige Test wird angewandt, da das Vorzeichen des Korrelationskoeffizienten vor Bestimmung der Wertepaare nicht sicher feststand.

Innerhalb der Altersgruppe b war sowohl bei Plasma- als auch Liquorwerten das Nichtvorhandensein einer Korrelation offensichtlich. Es wurden deshalb nur die Korrelationskoeffizienten für Altersgruppe c, sodann für die zusammengekommenen Wertepaare der Gruppen b und c und für sämtliche Wertepaare geprüft.

Nullhypothese ist, daß r nicht signifikant verschieden von Null ist. Sie wird abgelehnt, wenn die Prüfgröße $t > t_{n-2}$ ist.

Tabelle 19 a : Prüfung der Korrelationskoeffizienten des Zusammenhangs Liquor-PLP-Konzentration/Alter

Altersgruppe	r	$t = r \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}$	FG	Tafelwert	Signifikant
c) $x \geq 1$ Jahr	-0,21	1,664	61	2,002	nein
d) Gruppen(b)+(c)	-0,24	2,151	75	1,992	ja
e) Gr. (a)+(b)+(c)	-0,20	1,837	83	1,988	nein

Tabelle 19 b : Prüfung der Korrelationskoeffizienten des Zusammenhangs Plasma-PLP-Konzentration/Alter

Altersgruppe	r	$t = r \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}$	FG	Tafelwert	Signifikant
c) $x \geq 1$ Jahr	-0,16	1,317	66	1,995	nein
d) Gruppen(b)+(c)	-0,17	1,524	78	1,991	nein
e) Gr. (a)+(b)+(c)	-0,15	1,407	86	1,988	nein

Die in den Regressionsgeraden erkennbare Tendenz zu sinkenden PLP-Spiegeln bei steigendem Lebensalter ist bezüglich der Plasma-PLP-Spiegel nicht signifikant. Ein interessanter Effekt zeigt sich jedoch bei dem einzigen signifikanten Korrelationskoeffizienten, der die Abhängigkeit der Liquor-PLP-Konzentration vom Alter dokumentiert. Betrachtet man die Altersgruppe c (≥ 1 Jahr) allein, ist der Zusammenhang zwischen Alter und PLP-Gehalt nicht signifikant. Er wird jedoch signifikant, wenn man die Altersgruppe b hinzunimmt und dokumentiert dadurch einen

Unterschied zwischen der Gruppe der Individuen bis zum Alter von 1 Jahr und den älteren Personen. Wie schon oben erwähnt, stellt sich hier die Frage, ob es zulässig ist, alle Altersgruppen zusammenzufassen und einer gemeinsamen Regressionsanalyse zu unterwerfen, da jede der Gruppen zwar für sich genommen normalverteilt zu sein scheint, aber alle Meßwerte zusammen sich nicht einer Glockenkurve unterordnen lassen.

Es besteht also die Möglichkeit, daß es sich bei der signifikanten Korrelation der Liquor-PLP-Werte mit dem Alter bei Zusammenlegung der Gruppen b und c um eine Scheinkorrelation handelt, die aufgrund der Inhomogenität der Gruppen zustande kommt. Tatsache bleibt jedoch, daß das Signifikantwerden der Korrelation durch Hinzunahme der Altersgruppe b auf einen Unterschied zwischen diesen Gruppen hindeutet. Es erhebt sich dann allerdings die Frage, welcher Faktor kausal ist für das differente Verhalten der Liquor-PLP-Konzentrationen dieser Altersgruppen.

7.5.4 Vergleich der Mittelwerte von Liquor-PLP-Konzentration, Plasma-PLP-Konzentration und Liquorproteingehalt dreier Altersgruppen

Der vermutete Zusammenhang zwischen Veränderungen des Liquorproteingehalts und des Plasma-PLP-Gehalts mit Änderungen der Liquor-PLP-Konzentration soll hier näher betrachtet werden.

Tabelle 20 : Mittelwerte der Liquor- und Plasma-PLP-Konzentrationen sowie der Liquorprotein-Konzentrationen von drei Altersgruppen

Altersgruppe	Liquor- PLP ng/ml	Plasma- PLP ng/ml	Liquor- protein mg%
a) $x \leq 4W$	<u>$11,0 \pm 6,2$</u> (5,5 - 20,6) n = 8	<u>$11,1 \pm 7,5$</u> (1,6 - 25,1) n = 8	<u>$177,3 \pm 89,9$</u> (100 - 373) n = 8
b) $4W < x < 1J$	<u>$4,6 \pm 2,1$</u> (1,4 - 9,2) n = 14	<u>$11,9 \pm 9,3$</u> (2,3 - 31,6) n = 12	<u>$35,4 \pm 14,8$</u> (15 - 67) n = 14
c) $x \geq 1J$	<u>$3,0 \pm 1,5$</u> (0,7 - 8,1) n = 64	<u>$7,1 \pm 4,2$</u> (0,2 - 29,9) n = 69	<u>$35,0 \pm 15,1$</u> (10 - 72) n = 67

Vergleich der Mittelwerte anhand des Zweistichproben-t-Tests.

Es wird jeweils der Mittelwert einer Altersgruppe auf Unterschiedlichkeit vom Mittelwert der nächst höheren Altersgruppe geprüft. Nullhypothese ist $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$; diese wird abgelehnt, wenn $t > t_{n_1 + n_2 - 2}$, ist.

Altersgruppe (a) :	$x \leq 4$ Wochen	; Mittelwert :	$\bar{x}_a$
Altersgruppe (b) :	$4 \text{ Wochen} < x < 1 \text{ Jahr}$	; Mittelwert :	$\bar{x}_b$
Altersgruppe (c) :	$x \geq 1 \text{ Jahr}$	; Mittelwert :	$\bar{x}_c$

Ergebnisse :

Liquor-PLP-Konzentration	Plasma-PLP-Konzentration	Liquorprotein-Konzentration
$\bar{x}_a \neq \bar{x}_b$	$\bar{x}_a = \bar{x}_b$	$\bar{x}_a \neq \bar{x}_b$
$\bar{x}_b \neq \bar{x}_c$	$\bar{x}_b \neq \bar{x}_c$	$\bar{x}_b = \bar{x}_c$

Hierbei sind folgende Zusammenhänge interessant:

- 1) Der Mittelwert der Liquorkonzentrationen der Altersgruppe b ist signifikant größer als derjenige der Gruppe c, obwohl die Mittelwerte der Proteinkonzentrationen sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. Der Mittelwert der Plasma-PLP-Konzentration der Gruppe b ist jedoch ebenfalls signifikant größer als derjenige der Gruppe c. Hier korreliert also die hohe Liquor-PLP-Konzentration mit einer ebenfalls hohen Plasma-PLP-Konzentration.
- 2) Der Mittelwert der Liquor-PLP-Konzentrationen der Altersgruppe a unterscheidet sich signifikant von dem der Gruppe b, obwohl die Mittelwerte der Plasma-PLP-Konzentrationen dieser Altersgruppen sich nicht signifikant unterscheiden. Der Mittelwert der Liquorprotein-Konzentration der Gruppe a ist jedoch ebenfalls signifikant größer als derjenige der Gruppe b. Hier korreliert also die hohe Liquor-PLP-Konzentration mit einer hohen Liquorprotein-Konzentration.

Möglicherweise sind also sowohl Liquorprotein-Konzentration als auch die Plasma-PLP-Konzentration Einflußgrößen für den Liquor-PLP-Gehalt.

Fraglich ist jedoch insbesondere, ob das hohe Liquorprotein bei Früh- u. Neugeborenen einen kausalen Einflußfaktor für die Erhöhung des Liquor-PLP darstellt.

7.5.5 Korrelation von Liquorproteingehalt und Liquor-PLP-Konzentration

Bisher wurde noch nicht der Einfluß pathologisch erhöhter Liquorprotein-konzentrationen auf den Liquor-PLP-Gehalt betrachtet. Im folgenden Diagramm (Abb. 36) werden jeweils Liquorgesamtprotein und Liquor-PLP bei Patienten mit verschiedenen Krankheitsbildern gegenübergestellt und mit den entsprechenden Normalwerten verglichen. Als weitere Vergleichsmöglichkeit sind noch die Gruppe für Frühgeborenen- und Neugeborenen der Perinatalperiode aufgenommen, also die Individuen mit "physiologisch" erhöhten Liquorproteinspiegel, und die Gruppe der Personen mit erhöhtem Plasma-PLP-Spiegel, um auch die Wirkung dieser Einflußgrösse auf die Liquor-PLP-Konzentration im Zusammenhang mit dem Liquorprotein verdeutlichen zu können.

Wieder sind Patienten mit Krampfsymptomatik aus dem Diagramm weggelassen.

Erläuterungen zu Abb. 36 : Betrachtet man den Zusammenhang zwischen Liquorprotein und Liquor-PLP im Normalbereich beider Parameter (•), so ergibt sich folgende Regression:

$$y = 0,01 x + 3,09 ; \quad r = - 0,01;$$

das heißt, die beiden Parameter sind in diesem Bereich unabhängig voneinander.

Erhöhte Proteinwerte im Liquor sind jedoch, wie aus dem Diagramm hervorgeht, vielfach mit Veränderungen des Liquor-PLP-Spiegels gekoppelt. Es zeigt sich jedoch, daß mit solchen Erhöhungen nicht immer gleichsinnige Änderungen der PLP-Konzentration im Liquor einhergehen. Beispielsweise zeigen einige Patienten mit Meningitis (○), selbst bei extrem erhöhten Liquorproteinspiegeln, sehr niedrige PLP-Konzentrationen im Liquor.

Bei den Individuen mit physiologischerweise hohen Liquorproteinkonzentrationen (■) scheint eine positive Korrelation zwischen diesem Parameter und dem Liquor-PLP zu bestehen, ebenso bei einigen Patienten mit

Hydrocephalus (□).

Man darf jedoch hierbei nicht außer Acht lassen, daß in diesen beiden Gruppen Liquor-PLP-Werte auftreten, die ein Vielfaches der Plasma-Konzentrationen betragen, das heißt eine Erhöhung der Permeabilität der Blut-Liquor-Schranke als alleinige Ursache für die hohen PLP-Spiegel im Liquor ist wohl auszuschließen.

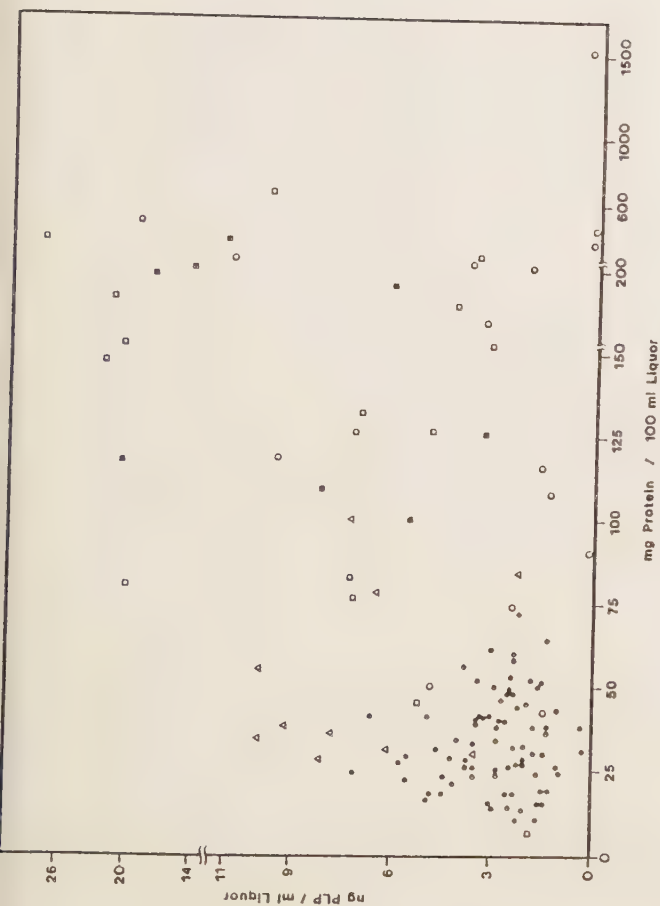


Abb 36 : Zusammenhang zwischen Liquor-Protein- und Liquor-PLP-Konzentration

- (●) : Individuen mit normalem Liquorproteingehalt
- (△) : Personen mit hohem Plasma-PLP-Gehalt (> 30 ng/ml)
- (○) : Patienten mit Meningitis
- (■) : Früh- und Neugeborene
- (□) : Patienten mit Hydrocephalus

7.5.6 PLP-Spiegel im Liquor cerebrospinalis bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen des ZNS

In den folgen Tabellen werden die PLP-Konzentrationen im Liquor und Plasma von Patienten mit Meningitis, Hydrocephalus und Krampfanfällen zusammengefaßt.

In Anbetracht der bisher gezeigten Zusammenhänge wird man eine Wertung des Liquor-PLP-Gehalts als möglichen Indikator für einen pathologischen Zustand des ZNS immer im Zusammenhang mit den als Einflußgrößen vermuteten Parametern vornehmen müssen.

Sehr niedrige PLP-Konzentrationen im Liquor kommen auch in der Normalpopulation vor. Ein geringer Liquor-PLP-Gehalt für sich allein genommen wird also wenig Aussagekraft besitzen, jedoch auffällig werden, wenn er sich zu einem der angenommenen Zusammenhänge gegensinnig verhält.

Beispielsweise wird die niedrige PLP-Konzentration bei einer alten Person mit gleichzeitig niedrigem Serum-PLP-Spiegel und normalem oder geringem Liquorproteingehalt als normal erscheinen, jedoch bei einem Neugeborenen oder Säugling mit hohem Plasma-PLP-Gehalt und hohem oder normalem Liquorprotein auffällig sein.

In den folgenden Tabellen werden deswegen grundsätzlich, soweit möglich, die vermuteten Einflußgrößen Alter, Plasma-PLP und Liquorprotein zum Vergleich dem Liquor-PLP-Wert beigelegt.

Patient	Alter	Liquor-PLP	Plasma-PLP	Liquor-protein (mg%)	Liquor-zellzahl	Diagnose
S. F. *	5/12	0		440	760	Pneumokokken-Meningitis mit Status epilepticus im Verlauf
M. N. *	4 6/12	0,2		359	345	Rezidivierende eitrige Meningitis mit Krampfanfall
W. T. *	7	0,3	4,0	1500	9600	Hämophilus influenzae-Meningitis
H. F. *	2/12	3,8		272	11500	Hämophilus influenzae-Meningitis mit Krampfanfall
K. S. *	1 9/12	1,6		116	900	Hydrocephalus. Liquorinfekt mit Pseudomonas
H. D.	1/12	1,4		42		Meningitis
K. H.	15	0		90	322	Hämophilus influenzae-Meningitis
H. G. *	10/12	4,8		50	27	Meningokokkensepsis mit Meningitis
		9,5		118		
K. C.	40	10,9	39,0	251	687	Lymphocytäre Meningoencephalitis in Remission
		2,4	12,5	74	3	
R. U.	39	1,3	7,0	108		Remittierte lymphocytäre Meningoencephalitis

* : Meningitiden mit malignem Verlauf

Tabelle 22 : PLP im Liquor cerebrospinalis bei Patienten mit Hydrocephalus

Patient	Alter (Jahre)	Liquor-PLP (ng/ml)	Plasma-PLP (ng/ml)	Liquor- protein (mg%)	Diagnose
A. M.	1/12	4,9	7,9	126	Frühgeb., 32. SSW, Hydrocephalus internus, Z.n. Ventrikelblutung
K. P.	9/12	3,1 7,2		152 126	Ventilversorgter Hydrocephalus
M.	1/12	20,6		153	
P. D.	4/12	9,8 28,7 21,5 85,0 7,3		660 364 182 82	Ventilversorgter Hydrocephalus
S. A.	4/12	7,0		132	Frühgeb., 30. SSW, Ventilversorg- ter Hydrocephalus
W. C.	1/12	19,3		468	
D. M.	1/12	84,0		2200	Hydrocephalus bei Gehirnmetas- tasen
W. Ch.	1/12	21,6		80	Kongenitaler Hydrocephalus
K. S.	2/12	4,2 5,2	13,6 4,7	174 45	Myelomeningocele, Hydrocephalus

Fortsetzung von Tabelle 22 . Patienten des Alters ≥ 1 Jahr.

Patient	Alter (Jahre)	Liquor-PLP (ng/ml)	Plasma-PLP (ng/ml)	Liquor- protein (mg%)	Diagnose
G. F.	5 1/2	22,3	37,2	147	Hydrocephalus internus, rezidivierende Krampfanfälle
S. R.	3 1/2	3,6	4,9	280	Ventilversorgter Hydrocephalus, Hirndruck, Null-Linien-EEG
E. M.	2	1,8		6	Ventilvers. Hydroceph., Liquorabnahme bei Katheterwechsel
K. S. *	1 9/12	1,6		116	Ventilvers. Hydroceph., Wundinfekt, mit Liquorpleocytose
Kontrollgruppe	$x \leq 4$ Mo.	$11,0 \pm 6,2$	$11,1 \pm 7,5$	177 ± 89	
Kontrollgruppe	$4 \text{ Mo.} < x < 1 \text{ J.}$	$4,6 \pm 2,1$	$11,9 \pm 9,3$	35 ± 15	
Kontrollgruppe	$x \geq 1 \text{ J.}$	$3,0 \pm 1,5$	$7,1 \pm 4,2$	35 ± 15	

* : Patient K. S. erscheint auch in der Tabelle "Meningitiden" (s. a. Kasuistik)

Tabellen 23 : PLP im liquor cerebrospinalis bei Patienten mit cerebralen Anfällen

Tabelle 23 a : Infektkrämpfe

Patient	Alter (Jahre)	Liquor-PLP (ng/ml)	Plasma-PLP (ng/ml)	Liquor- protein (mg%)	Diagnose
P. A.	11/12	5,1	10,8	28	Fieberhafter viraler Infekt
H. C.	7/12	3,0	10,1	16	Fieberhafter viraler Infekt
K. T.	3/12	4,9		41	V. a. Sepsis
R. C.	5/12	5,4	13,2	27	Diarrhoe, V.a. viralen Infekt
G. D.	9/12	2,4		21	Laryngo - Tracheo - Bronchitis
G. N.	4	4,2	15,8	18	Eitrige Tonsillitis
F. B.	2 3/12	4,2		10	V. a. viralen Infekt
W. S.	1 7/12	1,2	16,3	24	Fieberhafter viraler Infekt
F. T.	4 4/12	4,9	6,0	34	Otitis media, V.a. gastro- intestinale Infektion
Kontrollgruppe	4 Mo. < x < 1 J.	4,6 ± 2,1	11,1 ± 7,5	35 ± 15	
Kontrollgruppe	x ≥ 1 J.	3,0 ± 1,5	11,9 ± 9,3	35 ± 15	

Tabellen 23: PLP im Liquor cerebrospinalis bei Patienten mit cerebralen Anfällen

Tabelle 23b: Chronisch rezidivierende, symptomatische cerebrale Anfälle

Patient	Alter (Jahre)	Liquor-PLP (ng/ml)	Plasma-PLP (ng/ml)	Liquor- protein (mg%)	Diagnose
S. M.	1/12	3,6	23,1	208	Frühgeb. 32. SSW, Postasphyxie-Syndrom, ICH Grad III, Hydrocephalus
D. T.	5/12	3,3	5,3	40	Zentrale Koordinationsstörung, bei V.a. perinatale Hirnschädigung
K. T.	2/12	2,5	6,0		BNS - Krämpfe, V.a. cerebrale Bewegungsstörung
B. J.	2/12	0,4	10,4	39	Hypotone zentrale Koordinationsstörung, Z.n. ICH Grad I, Hirnreifungsstörung
B. T.	2/12	0,8	12,0	40	
		0,8	24,1	57	Perinatale Asphyxie, Embryofetopathie mit multiplen Mißbildungen
		0,2	30,6	61	Dandy - Walker - Syndrom
R. J.	3	4,6	11,1	25	Spastische Hemiplegie, erster Krampfanfall
A. K.	8	1,4		19	ALL, Krampfanfälle bei V.a. Hirnblutung
C. V.	1 6/12	1,3	0,2	12	BNS - Krämpfe, Frühkindl. Hirnschädigung

Tabellen 23 : PLP im Liquor cerebrospinalis bei Patienten mit cerebralen Anfällen

Tabelle 23 c : Cerebrale Anfälle unklarer Genese

Patient	Alter (Monate)	Liquor-PLP (ng/ml)	Plasma-PLP (ng/ml)	Liquor- protein (mg%)	Diagnose
P. S.	1/4	3,7	2,2	114	Frühgeburt 35.SSW, V.a. sept. Allgemeininfektion
A. S.	1/2	7,0	7,1	88	Frühgeb. 35.SSW, Ileumatresie bei Volvulus, Krampfanfälle
B. C.	9 1/2	8,9	23,1		Chronisch rezidivierende Krampf- anfälle
F. P.	3/4	0	8,7	140	Generalisierte tonisch-klonische Krämpfe
C. A.	10	0,8	13,2	48	V.a. Affektkrämpfe, Statomotor. Entwicklungsretardierung
A. A.	7	6,2	11,1		Medikamentös kaum beeinflussbare Anfälle, Massenschwund d. Cortex
M. M.	21	2,3	10,9	18	Erster cerebraler Anfall

Tabellen 23 : PLP im Liquor cerebrospinalis bei Patienten mit cerebralen Anfällen

Tabelle 23 d : Cerebrale Anfälle bei Jugendlichen und Erwachsenen

Patient	Alter (Jahre)	Liquor-PLP (ng/ml)	Plasma-PLP (ng/ml)	Liquor- protein (mg%)	Diagnose
M. D.	18	2,4	7,6	57	Cerebrales Anfallsleiden
S. E.	76	0,2		24	V. a. cerebralen Gefäßprozeß
V. C.	13	3,0	4,7	41	Z. n. lymphat. Leukämie, Psycho- motor. Anfälle, geistig retard.
S. M.	45	2,7	6,6	40	Cerebrales Anfallsleiden
Kontrollgruppe	$\bar{x} \pm s.d.$	$3,0 \pm 1,5$	$11,1 \pm 7,5$	35 ± 15	

Tabellen 23 : PLP im Liquor cerebrospinalis bei Patienten mit cerebralen Anfällen

Tabelle 23 e : Stoffwechselkrämpfe

Patient	Alter (Monate)	Liquor-PLP	Plasma-PLP	Liquor- protein (mg%)	Diagnose
B. N.	1/4	2,5	23,7	124	Transitorischer Hypoparathyreo- idismus
K. Ö. *					V. a. Vitamin B6-abhängige Krampfanfälle

* : Patient K. Ö. : Für PLP - Werte und Symptomatik siehe Kasuistik (S.175)

7.6 DISKUSSION

7.6.1 Vergleichswerte für Liquor-PLP-Messungen

Die Literatur über Messungen von Vitamin B 6 im Liquor cerebrospinalis beim Menschen ist sehr spärlich. Es wurden insbesondere nur wenige Arbeiten über Pyridoxalphosphat im Liquor gefunden.

Tabelle 24 gibt eine Übersicht über die uns bekannt gewordenen Arbeiten, die Messungen des Vitamin B 6-Gehalts im Liquor beinhalten.

Tabelle 24 : Vergleichswerte für den Liquor-PLP-Gehalt

Autor	Gemessene B-6-Metaboliten	Gehalt ng/ml	n	Bestimmungsmethode
Dastur et al. (44)	Total	6,4	7	Mikrobiolog.
Bain u. Williams (5)	Total	10		Mikrobiolog.
Wolf (173)	alle phosphorylierten Formen	12		Mikrobiolog.
Botteri et al. (23)	PLP	1,5	69	Tyrosindecarboxylase
Hallert et al. (69)	PLP	0,24	8	Tyrosindecarboxylase*
Tower (162)	PLP	40**	1	Tyrosindecarboxylase

* : Mit L-Dopa als Substrat (siehe Text).

** : Nach Therapie mit Vitamin B 6 (siehe Text).

Dastur et al. fanden bei Alkoholikern mit peripherer Neuropathie $3,4 \pm 0,17$ ng/ml Vitamin B 6 im Liquor, bei Alkoholikern mit peripherer Neuropathie und mentalen Veränderungen $1,65 \pm 0,13$ ng/ml. Der Kontrollwert war $6,4 \pm 0,45$ ng/ml.

Der Plasma-Mittelwert der ersten Gruppe von Alkoholikern war 18,6 ng/ml, derjenige der zweiten Gruppe 15,0 ng/ml bei einem Kontrollwert von 37,2 ng/ml. Daraus geht hervor, daß der Liquor-PLP-Spiegel

den neurologischen Status der Patienten präziser reflektiert als der Plasma-PLP-Spiegel, da sich die Mittelwerte der Liquorkonzentration der Patientengruppen untereinander signifikant voneinander unterschieden, im Gegensatz zu den Plasmakonzentrationen (44). Botteri et al. untersuchten die Liquor-PLP-Spiegel von 74 Patienten höheren Alters (50 - 90 Jahre) mit cerebralen Symptomen, die hauptsächlich auf atherosklerotische Ursachen zurückgeführt wurden. Sie fanden im Mittel 1 bis 3 mal so hohe PLP-Konzentrationen im Plasma wie im Liquor. Innerhalb dieser Gruppe konnte keine Altersabhängigkeit festgestellt werden (23).

Tower fand bei einem 19jährigen Patienten mit Krampfanfällen nach einer sechstägigen Pyridoxingabe von 300 mg/die eine Liquor-PLP-Konzentration von 40 ng/ml (Tyrosindecaboxylasemethode, manometrische CO₂-Bestimmung) (162).

Hallert et al. untersuchten die Plasma- und Liquor-PLP-Konzentrationen bei erwachsenen Zöliakie-Patienten. Sie fanden in einer Normalgruppe $0,24 \pm 0,07$ ng/ml PLP im Liquor, bei der Patientengruppe $0,60 \pm 0,34$ ng/ml. Im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Autoren sind diese Werte sehr niedrig. Hallert et al. verwendeten die Decarboxylierung von L-Dopa zu Dopamin durch Tyrosindecaboxylase und Bestimmung von Dopamin durch HPLC als Nachweismethode (69). Wolf verwendete eine mikrobiologische Methode zur Bestimmung der phosphorylierten B 6-Metaboliten im Liquor. Bei diesen Methoden werden Proben in 0,055 M HCl hydrolysiert, da nur freie Vitamin B 6-Formen für Mikroorganismen verwertbar sind. Wolf fand, daß bei der Verwendung von Plasmaproben 4 - 5 Stunden Hydrolyse notwendig waren, um alles Vitamin in freie Formen überzuführen. Im Liquor genügte schon eine Stunde Hydrolyse, woraus er schloß, daß hier keine Eiweißbindung von Vitamin B 6 vorliegt. Dies stimmt mit unseren Befunden überein. Wolf gab außerdem an, daß keine Unterschiede der Vitamin B 6-Konzentration im Liquor zwischen Kindern mit Krämpfen gegenüber Kindern ohne Krampfanamnese gefunden wurden, ohne dies näher zu spezifizieren (173).

7.6.2 Bedeutung des Liquor-PLP-Gehalts als Indikator:
Transport und Metabolismus von Vitamin B 6 im Gehirn

Für die Beurteilung des Werts eines Liquorbestandteiles als Indikator von Erkrankungen des ZNS sind dessen Herkunft und sein Transport in den Liquor cerebrospinalis von Interesse.

Bezüglich der Vitamine führten Spector et al. Untersuchungen durch. Ihre in vitro-Experimente behandelten unter anderem die Frage, ob und unter welchen Bedingungen Gehirngewebe und isolierter Plexus chorioideus radioaktiv markierte Vitamin B 6-Formen akkumulieren und freisetzen. Hierzu wurden Dünnschnittpräparate von Kaninchengehirnen und Plexus chorioideus-Gewebe in Medien inkubiert, denen ^3H - ^{32}P -PNP (Pyridoxinphosphat) oder ^3H -PN (Pyridoxin) zugegeben wurde (153, 154).

Es stellte sich heraus, daß beide Gewebe PNP nur sehr langsam akkumulierten, außerdem lag es nach der Inkubation intrazellulär nicht als ^3H - ^{32}P -PNP vor, sondern als ^3H -PNP (also mit nicht markiertem Phosphat phosphoryliert), ^{32}P fand sich im extrazellulären Medium wieder. Wurde Phosphat zusammen mit ^3H - ^{32}P -PNP zum Medium gegeben, war die Akkumulation von ^3H - ^{32}P -PNP vollständig unterdrückt.

Der nicht phosphorylierte Metabolit PN wurde dagegen schnell intrazellulär angereichert, auch bei Anwesenheit von Phosphat im Inkubationsmedium. Auch hier lag in der Zelle die tritiierte Substanz zu 85 % als ^3H -PNP vor, wurde also ebenfalls intrazellulär phosphoryliert (153, 154).

Zugabe des Antimetaboliten 4'-Desoxypyridoxin zum Medium zeigte den gleichen Effekt wie Phosphat bezüglich der phosphorylierten Metaboliten, hemmte jedoch zusätzlich die Aufnahme der nicht phosphorylierten Form. Die Hemmung des Transports lief dabei genau parallel zur Inhibition von Pyridoxalkinase. Der Transport von ^3H -Pyridoxin wurde ebenso durch Pyridoxalazin gehemmt, einen Blocker der Pyridoxalkinase, außerdem durch niedrige Temperaturen.

Spector et al. schlossen aus diesen Ergebnissen, daß sowohl der Transport von Vitamin B 6 aus dem Blut in den Liquor als auch der Transport aus dem Liquor oder Blut in die Gehirnzellen ein energieabhängiger, sättigbarer spezifischer Prozeß ist, wahrscheinlich folgenden Verlaufs: Phosphorylierte Metaboliten, also die eigentlichen Speicherformen von Vitamin B 6, müssen, um intrazellulär aufgenommen werden zu können, erst durch eine Phosphatase dephosphoryliert werden. Die dephosphorylierten Formen treten dann auf noch

nicht endgültig geklärtem Weg (aktiver Transport, Diffusion) in die Zelle ein, können dort aber nur durch Rephosphorylierung angereichert werden (nicht phosphoryliertes ^3H -Pyridoxin wird weder im Gehirn noch im Plexus chorioideus akkumuliert).

Dieses Modell wird unterstützt durch in vivo-Befunde. Bei Kaninchen fanden die Autoren Vitamin B 6-Konzentrationen, die im Mittel das 1,3-fache der Plasmakonzentrationen betrug. Im Vergleich hierzu erreicht Mannit, dessen Löslichkeit und Molekulargewicht etwa dem von Vitamin B 6 entspricht, und das durch einfache Diffusion in den Liquor übertritt, lediglich einen Liquor/Plasma-Quotienten von 0,2. Nach intravenöser Injektion von ^3H -PN bei Kaninchen wurde dessen Aufnahme in Gehirnzellen, den Plexus chorioideus und den Liquor gehemmt, wenn gleichzeitig unmarkiertes PN infundiert wurde.

Diese beiden Befunde sind ebenfalls Hinweise auf einen spezifischen Transportprozeß für Vitamin B 6 in das ZNS.

Bezüglich des Transports von Vitamin B 6 aus dem Liquor in das Gehirn oder das Blut fanden Spector et al., daß die Aufnahme von tritiiertem Vitamin B 6 ins Gehirn (wenn es intracerebroventrikulär injiziert wurde) signifikant vermindert war, wenn zusätzlich unmarkiertes Pyridoxin injiziert wurde. Ebenso war der Ausstrom von markiertem PN aus dem Liquor ins Blut stark vermindert. Diese Ergebnisse und die Tatsache, daß tritiiertes Vitamin B 6 schneller aus dem ZNS ins Blut transportiert wird als das frei diffundierende Mannit, deuteten auf das Vorhandensein eines bidirektional wirkenden Transportsystems für Vitamin B 6 hin.

Zusammen mit dem Befund, daß Pyridoxin, intraarteriell injiziert, bei einmaligem Durchlaufen der Gehirnzirkulation nicht schneller aus dem Blut ins Gehirn aufgenommen wird als Mannit, also kein nennenswerter aktiver Transport aus dem Blut direkt ins Gehirn stattfindet, wurden diese Ergebnisse dahingehend gedeutet, daß speziell der Plexus chorioideus für die Bereitstellung eines Vitamin B 6-Pools für das Gehirn zuständig ist (152). Dies wird durch folgende Beobachtungen unterstützt: Vom Plexus chorioideus werden hauptsächlich phosphorylierte Vitamin B 6-Formen in den Liquor freigesetzt, Gehirnzellen geben praktisch kein phosphoryliertes Vitamin B 6 in den Liquor ab (153). Die Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Vitamin B 6 zeigten außerdem, daß offensichtlich hauptsächlich phosphorylierte Formen im Liquor vorliegen.

Tiselius fand nach i.v.-Injektion von ^3H -Pyridoxin bei Mäusen folgenden Verlauf der PLP-Konzentration im Gehirn: 10 Minuten nach der Injektion lagen 17 % der Radioaktivität im Gehirn als ^3H -PLP vor, nach 40 Minuten 60 %. Im weiteren Verlauf bis 13 Tage nach Injektion hielt sich die ^3H -PLP-Konzentration relativ konstant auf ca. 50 %, die PMP-Konzentration schwankte stark zwischen 28 und 56 %, die restlichen Formen lagen in Konzentrationen unter 10 % der Gesamtradioaktivität vor (161).

In diesen Untersuchungen zeigte sich PLP also als die im Gehirn mengenmäßig vorherrschende Form von Vitamin B 6, außerdem als diejenige mit dem konstantesten Konzentrationsverlauf und dem schnellsten Konzentrationsanstieg im Gehirn nach Pyridoxingabe.

Ein interessantes Ergebnis der Arbeit von Tiselius ist, daß im Vergleich zur Akkumulation von PN und PNP im Gehirn die Aufnahme in den Liquor schneller geschieht.

Nach Applikation von PNP wird nach einer Stunde ein Serum /Liquor-Quotient von 0,94 erreicht, also der Ausgleich der Konzentrationen, nach 3 Stunden ist sogar eine Anreicherung im Liquor festzustellen, dann beträgt der Serum/Liquor-Quotient ca. 0,6.

Im Vergleich dazu ist eine Stunde nach Applikation von PNP der Serum/Gehirn-Quotient noch ca. 3, nach 3 Stunden 1,25.

Für Pyridoxin besteht nach 20 Minuten ein Serum/Liquor-Quotient von ca. 1,0. Der Konzentrationsausgleich ist im Gehirn erst nach ca. 70 Minuten erreicht. Der Quotient Serum/Gehirn sinkt dann allerdings innerhalb von 3 Stunden auf den Wert 0,2, das heißt, es findet eine starke Anreicherung im Gehirn statt (161).

Spector et al. stellten bei ähnlichen Versuchen fest, daß nach intracerebroventrikulärer Injektion von $^3\text{H}^{32}\text{P}$ -PNP nach 2 Stunden im Liquor ca. 60 % als ^3H -PNP vorlag. $^3\text{H}^{32}\text{P}$ -PNP mußte also dephosphoryliert und mit nicht markierten Phosphat rephosphoryliert worden sein. Eingedenk der Tatsache, daß nur der Plexus chorioideus phosphoryliertes Vitamin B 6 freisetzt, hieße dies, daß die Versorgung des Liquor mit diesen Formen ausschließlich durch dieses Organ stattfindet. Spector et al. hoben hervor, daß sowohl der Plexus chorioideus als auch die Leber Systeme zur Freisetzung phosphorylierter B 6-Formen besitzen. In Verbindung mit dem Befund, daß 70 bis 86% des Vitamin B 6 im Liquor phosphoryliert vorliegt und dort auch

akkumuliert werden kann, scheint eine Funktion des Plexus chorioideus als PLP-Produzent für das ZNS und des Liquor cerebrospinalis als Versorgungspool für PLP möglich zu sein. Hierzu müßte die Frage beantwortet werden, ob Vitamin B 6 hauptsächlich aus dem Liquor in das Gehirn eintritt. Wenn dies der Fall ist, wären Messungen der PLP-Konzentration im Liquor ein aussagekräftiger Parameter für den aktuellen Versorgungszustand des ZNS mit Vitamin B 6.

7.6.3 Interpretation der Meßergebnisse im Hinblick auf die PLP-Homöostase des ZNS

Die Sättigbarkeit von transportregulierenden Enzymreaktionen für Vitamine sichert das ZNS vor starken Schwankungen der Vitaminkonzentration, da in Abhängigkeit von der Michaeliskonstante bei sehr viel höheren Substratkonzentrationen als K_T keine reziproke Steigerung der Transportgeschwindigkeit auftritt. Bei Erhöhung der Blutkonzentration eines Vitamins über K_T hinaus wird also die Konzentrationssteigerung im ZNS relativ niedriger sein als diejenige im Blut. Andererseits wird bei niedrigen Blutspiegeln der ZNS-Gehalt relativ höher sein.

Sind mehrere solcher Transportsysteme hintereinandergeschaltet (Blut/Liquor, Liquor/Gehirn), werden im Zielkompartiment die Amplituden von Schwankungen sehr klein sein.

Spector et al. untersuchten dies für die Ascorbinsäure, deren Transportsystem für den Blut/Liquor-Transport eine Affinitätskonstante von $44 \mu\text{M}$ besitzt (Kaninchen). Die normale Plasmakonzentration von Ascorbinsäure beim Kaninchen wurde zu $57 \mu\text{M}$ bestimmt. Wurde die Plasmakonzentration auf das 10-fache erhöht, so stieg der Liquorgehalt lediglich auf das 2,5-fache an, das heißt der Liquor/Plasma-Quotient sank von 3,7, dem Wert bei normalem Plasmagehalt, auf 0,9 ab. Andererseits wurde bei niedrigen Plasmaspiegeln der Liquorgehalt durch relativ höheren Transport vor schnellem Absinken bewahrt: Bei Senkung des Plasmagehalts auf 1/10 der Normalkonzentration fiel die Liquorkonzentration nur auf 1/5 des Normalwerts (155).

Ascorbinsäurekonzentration im Liquor cerebrospinalis als Funktion der Plasmakonzentration. (nach Spector et al., (155)) .

Plasma- Ascorbinsäure μM	Liquor- Ascorbinsäure μM	Quotient Liquor/Plasma- Ascorbinsäure
5,7	40	7,0
57	210	3,7
568	506	0,9

Spector et al. führten solche Versuche zwar nicht mit Vitamin B 6 durch, da sie aber entsprechende Transportsysteme auch hierfür nachweisen konnten, mag es als erlaubt erscheinen, die in unserer Untersuchung erhobenen Befunde unter diesem Aspekt zu betrachten. Hierzu werden die Meßwerte der Abb. 31 verwendet. Die Regressionsgleichung für den Zusammenhang zwischen Liquor- und Plasma-PLP zeigt, daß bei sehr kleinen Plasmakonzentrationen die zugehörigen Liquorkonzentrationen diejenigen im Plasma übersteigen. Aus der Gleichung berechnet sich der theoretische Liquorgehalt bei der Plasmakonzentration von 0 ng/ml zu 1,1 ng/ml. Dies steht im Einklang mit den oben erwähnten Befunden, die typisch sind beim Vorliegen eines aktiven Transportsystems.

Greift man aus der Population der Abb. 31 drei Gruppen von jeweils 10 Individuen heraus, diejenigen mit den niedrigsten PLP-Plasmakonzentrationen, diejenigen die einem Wert von 10 ng/ml am nächsten liegen und die mit den höchsten Plasmakonzentrationen, bildet davon jeweils die Mittelwerte und vergleicht sie mit den zugehörigen Liquorwerten, ergibt sich folgendes Bild:

	Plasma-PLP ng/ml	Liquor-PLP ng/ml	Quotient Liquor-/Plasma- PLP
10 Personen mit nied- rigem Plasma-PLP-Geh.	1,6	1,6	1,0
10 Personen mit Plas- ma-PLP-Geh. um 10ng/ml	10,3	3,6	0,35
10 Personen mit hohem Plasma-PLP-Geh.	41,5	6,0	0,15

Bei den Personen, deren Plasmakonzentrationen im Mittel etwa das Vierfache des Normalwerts betragen, wächst die Liquorkonzentration nur auf das 1,7-fache an, in der Gruppe, deren Plasma-Mittelwert etwa 1/6 des Normalwerts beträgt, sinkt der Liquorgehalt durchschnittlich nur auf die Hälfte des Normalwerts ab.

Die in Abb. 31 gezeigte Regressionsgerade der Gleichung $Y = 0,19 x + 1,40$ ergibt bei den Plasmawerten von 1,6 / 10,3 / 41,5 ng PLP zugehörige Liquorwerte von 1,8 / 3,3 / 9,0 ng/ml.

Dabei fällt die Abweichung der tatsächlich gemessenen Liquorkonzentrationen in der Gruppe mit hohem Plasma-PLP-Gehalt gegenüber dem berechneten Wert auf, was im Einklang mit der oben erwähnten Theorie der Homöostasemechanismen steht, jedoch die Anwendung einer linearen Regression zumindest in diesem Wertebereich als unzulässig erscheinen läßt.

Es erscheint andererseits deswegen als wahrscheinlich, daß der Plasma-PLP-Gehalt eine Einflußgröße für den Liquorgehalt darstellt. Zwar kann, legt man die Erkenntnisse von Spector et al. zugrunde, kein nennenswerter direkter Austausch zwischen den PLP-Kompartimenten in Plasma und Liquor bestehen, einerseits wegen des fehlenden Transportsystems für phosphoryliertes Vitamin B 6, andererseits wegen der Albuminbindung von PLP im Plasma, doch sind die Konzentrationen der Transportformen Pyridoxal und Pyridoxin jeweils gleichsinnig mit dem PLP-Gehalt verändert, wodurch Rückschlüsse von der

PLP-Konzentration auf den Gesamtbestand zirkulierenden Plasmavitamins und damit den wichtigsten Versorgungs-Pool für das ZNS möglich erscheinen. Vielleicht kann die nicht sehr strenge Abhängigkeit von Liquor- und Plasma-PLP mit dem Koeffizienten von 0,54 als Ausdruck für eine indirekte Abhängigkeit gelten. Die Korrelation der Meßwerte gewinnt jedenfalls mit dieser Möglichkeit, sie durch aktiven, sättigbaren Transport zu erklären, an Plausibilität.

7.6.4 Liquor-PLP-Gehalt im frühen Lebensalter

An dieser Stelle soll die schon in Kapitel 7.5.3 erwähnte Beobachtung relativ hoher Liquor-PLP-Spiegel bei Neugeborenen und Säuglingen mit normalen oder niedrigen Plasma-PLP-Spiegeln besprochen werden.

Zwei Befunde sind dabei von besonderem Interesse: Einerseits ist dies die bei Säuglingen im Vergleich zur Altersgruppe ≥ 1 Jahr signifikant erhöhte mittlere Liquorkonzentration, die bei normalem Liquorprotein und signifikant höheren Plasma-PLP-Spiegeln auf einen Einfluß der Plasma-PLP-Konzentration auf den Liquorgehalt schließen läßt, andererseits fallen bei Frühgeborenen hohe Liquor-PLP-Spiegel bei niedrigem Plasma-PLP und hohem Liquor-Protein auf.

Bei insgesamt 12 Kindern, die jünger als 1 Jahr waren und als Normalgruppe angesehen wurden, konnten gleichzeitig gewonnene Liquor- und Plasmaproben untersucht werden. Die Meßwerte dieser Patienten sind in Tabelle 25 nach steigendem Alter der Kinder angeordnet. (Zur Ergänzung sind auch einige Liquorwerte von Kindern mit einbezogen, bei denen kein Plasmawert vorhanden war).

Tabelle 25 : Liquor- und Plasma-PLP im jüngsten Lebensalter

Alter	Liquor-PLP ng/ml	Plasma-PLP ng/ml	Liquor-Protein mg %
28. SSW, 1. Tag	17,9		196
27. SSW, 5. Tag	6,1		192
30. SSW, 2. Tag	20,6	9,4	117
32. SSW, 1. Tag	11,7	1,6	373
35. SSW, 1. Tag	5,5	8,3	100
35. SSW, 4. Tag	14,3		205
40. SSW, 1. Tag	3,3	14,9	126
40. SSW, 9. Tag	8,2	4,8	109
2 Monate	2,0	2,3	32
2,5 Monate	5,3	7,6	53
5 Monate	6,5	21,4	67
5 Monate	5,5	25,5	22
8 Monate	9,2	31,6	38
9 Monate	3,7	2,9	28
10 Monate	1,4	8,0	15

Berechnet man, trotz der geringen Fallzahlen, die Mittelwerte der Messungen bei Frühgeborenen, reif geborenen Kindern der Perinatalperiode und Säuglingen, ergeben sich folgende Zahlen:

Alter	Liquor-PLP	Plasma-PLP
Frühgeborene	12,6 $\pm$ 7,6 ng/ml	6,4 $\pm$ 2,4 ng/ml
Reifgeborene (Perinatalper.)	5,8 $\pm$ 3,5 ng/ml	9,9 $\pm$ 7,1 ng/ml
Säuglinge	4,2 $\pm$ 1,9 ng/ml	14,2 $\pm$ 11,8 ng/ml

Es findet sich eine "Schere" zwischen hohen Liquorkonzentrationen und niedrigen Plasmakonzentrationen bei Frühgeborenen und ein Umkippen des Liquor/Plasma-Verhältnisses bei steigendem Lebensalter. Die Frage ist nun, welche Einflüsse diesen Veränderungen zugrunde liegen können. Zunächst ist auf die Unreife der Blut-Liquor-Schranke bei Frühgeborenen hinzuweisen, deren Ausdruck unter anderem hohe Liquorproteinspiegel in dieser Gruppe sind. Statz und Felgenhauer (156, siehe auch Seite 123) fanden folgende Altersabhängigkeit der Albuminkonzentration im Liquor im jüngsten Lebensalter:

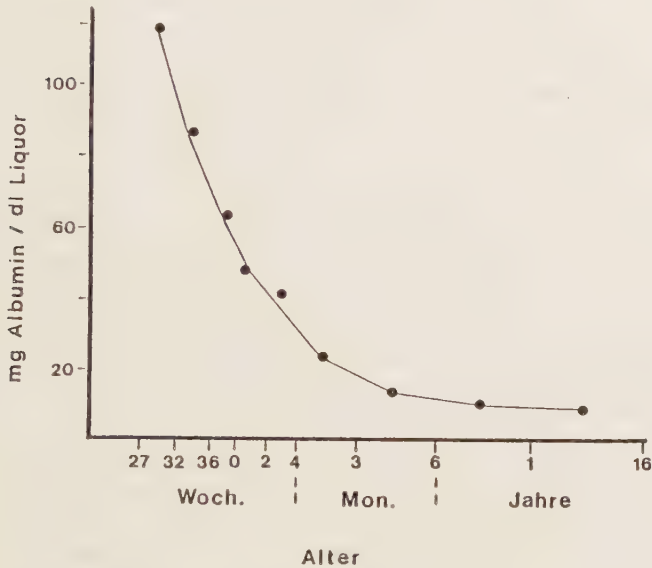


Abb. 37 : Altersabhängigkeit der Albuminkonzentration im Liquor
(Auszug aus Statz u. Felgenhauer (156)).

Die ganz ähnliche Tendenz der Liquor-PLP-Konzentration mit steigendem Lebensalter (siehe auch Abb. 34) fällt hierbei auf. Unklar bleibt hier allerdings, ob lediglich ein erhöhter Einstrom von PLP aus dem Plasma in den Liquor für diese Befunde ursächlich ist. Unter den Frühgeborenen der Tabelle 25 finden sich zwei, die weit höhere Liquor-PLP-Konzentrationen aufweisen als Plasmakonzentra-

tionen, auch bei einem der reifen Neugeborenen in der Perinatalperiode war ein Liquorwert vorhanden, der um 70 % höher lag als der Plasmawert. Dies scheint gegen eine Unreife der Blut-Liquor-Schranke als alleinige Ursache für Alterationen des Liquor-Vitamingehalts zu sprechen. Tatsächlich wird auch im Hinblick auf die erhöhte Permeabilität der Blut-Liquor-Schranke für Proteine bei Frühgeborenen eher eine Unreife des transzellulären Transports im Plexus chorioideus als unzureichend ausgebildete tight junctions vermutet (156). Das hieße, daß der erhöhte Proteingehalt im Liquor auch aus Nervenzellen oder Zellen des Plexus stammen könnte. Da die intrazelluläre Konzentration von PLP das mehrhundertfache der Liquorkonzentration beträgt, wären Unterschiede im Membrantransport bei sehr unreifen Kindern eine plausible Erklärung für die hohen Liquor-PLP-Werte.

Im Hinblick auf die gegenläufige Tendenz der Liquor- und Plasma-PLP-Konzentration bei steigendem Lebensalter sind noch folgende Arbeiten von Interesse: Reinken und Mangold (120) untersuchten den Serumgehalt von PLP bei 16 frühgeborenen Kindern mit Geburtsgewichten von 1900 g bis 2500 g. Sie fanden am ersten Lebenstag extrem niedrige Serumkonzentrationen von im Mittel 0,82 ng/ml. Der PLP-Gehalt stieg jedoch kontinuierlich an über 8,36 ng/ml am 7. Lebenstag bis 13,65 ng/ml am 13. Lebenstag. Die Autoren vermuteten, daß PLP-Speicher erst in den letzten Schwangerschaftswochen im Foetus aufgebaut werden und ihr Fehlen bei Frühgeborenen für die niedrigen Serum-PLP-Werte kurz nach der Geburt verantwortlich sein könnten.

Ejderhamn und Hamfelt (53) bestimmten PLP im Kapillarblut von reifen Neugeborenen 3 Stunden nach der Geburt und dann in Abständen von einigen Tagen. Sie fanden die höchsten Konzentrationen in den Blutproben, die kurz nach der Geburt gewonnen worden waren und beobachteten dann ein kontinuierliches Absinken bis auf 50 % des 3-Stunden-Wertes nach einer Woche.

Zum Liquor-PLP-Gehalt bei Kindern im hier besprochenen Lebensalter konnte keine Literatur gefunden werden. Es existieren aber Arbeiten über den Gehirn-PLP-Gehalt bei neugeborenen Versuchstieren.

Ebadi fand bei Ratten ein langsames Absinken der PLP-Konzentration im Gehirn von der Geburt an bis zum Alter von 60 Tagen (51). Demgegenüber zeigten Loo et al. daß die PLP-Konzentration im Rattenhirn von $1,32 \pm 0,24$ ng/ml im Alter von 1 Tag anstieg auf $2,85 \pm 0,82$ ng/ml nach 23 Tagen und $3,48 \pm 0,47$ ng/ml nach 120 Tagen (93).

Bhagavan et al. bestätigten die Befunde von Loo et al. . Sie fanden ebenfalls ein Ansteigen der PLP-Konzentration in vier Gehirnregionen mit wachsendem Lebensalter (17).

Der Grund für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von Ebadi und denjenigen der anderen beiden Gruppen konnte nicht eruiert werden (17).

7.6.5 Erläuterungen zu den Liquor-PLP-Befunden bei Patienten mit verschiedenen neurologischen Symptomen

7.6.5.1 Meningitis

Die Ergebnisse der Tabelle 21 lassen vermuten, daß purulente Entzündungen der Meningen eine Verringerung des Liquor-PLP-Gehalts zur Folge haben. Wenn diese Annahme richtig ist, stellt sich die Frage, ob der Vitamin B 6-Spiegel gleichsinnig mit anderen Parametern im Liquor verläuft und welche Ursachen den Konzentrationsänderungen zugrundeliegen. Bei den hier erfaßten Patienten wurden bei 3 mit rasch progredienten Verläufen sehr niedrige Liquor-PLP-Spiegel festgestellt, bei stark erhöhten Proteinspiegeln und Zellzahlen. Da bei anderen Störungen oder einer Unreife der Blut-Liquor-Schranke hohe Liquorproteinspiegel mit erhöhten PLP-Konzentrationen verknüpft zu sein scheinen, war dieser Befund bei den Meningitiden auffällig.

Es scheint hier ein Zusammenhang zu bestehen zwischen der Malignität des Verlaufs, also den gesetzten Schäden am ZNS und den Leptomeningen und dem Absinken des PLP-Spiegels. Bei 2 Patienten (S.F.; M.M.) war jedenfalls die Bedrohlichkeit der Erkrankung weit mehr durch die klinische Symptomatik charakterisiert als durch die Liquorbefunde für Protein und Zellen. Im einen Fall (Pneumokokkenmeningitis) trat ein Status epilepticus auf bei nur mäßig erhöhtem Liquorprotein und nicht excessiv erhöhter Zellzahl (Liquor-PLP: 0), im anderen Fall (M.M.) war auch während einer Remissionsphase, bei der die Liquorspiegel von Protein, Zellen und Glucose sich normalisierten, das Kind klinisch in schlechtem Zustand (Liquor-PLP: 0,2) .

Andererseits konnten im Liquor zweier erwachsener Patientinnen mit subakuten (lymphozytären) Meningoenzephalitiden bei erhöhten Proteinspiegeln auch erhöhte bzw. normale PLP-Spiegel festgestellt werden, ebenso bei einem Säugling mit Meningokokkensepsis mit Meningitis, bei dem allerdings schwere Funktionsstörungen des ZNS auftraten.

Es stellt sich die Frage, ob die bei purulenten Meningitiden ebenfalls häufig verminderten Liquorglucosekonzentrationen Parallelen zu den PLP-Spiegeln erkennen lassen. Sofern Verlaufsbeobachtungen anhand der Liquordaten möglich waren, wurden diese in den Fallbeschreibungen zusammengefaßt.

Im Hinblick auf den Transport an der Blut-Hirn-Schranke bestehen Gemeinsamkeiten zwischen Glucose und Vitamin B 6. Auch für Hexosen existiert ein bidirektionaler Carrier, es findet sich die Sättigbarkeit des Transports, kompetitive Hemmung durch Strukturanaloge und außer-

dem wird ebenfalls der Plexus chorioideus als Hauptort des Transports angenommen (58).

Klinisch ist ein niedriger Liquorglucosespiegel ein Indikator für eine diffuse leptomeningeale Entzündungsreaktion im Gegensatz zu fokalen Prozessen. Bei purulenter Meningitis wurde eine erhöhte Mortalität von Patienten mit Liquorglucosespiegeln unter 13 mg % festgestellt. Außerdem bestehen in manchen Fällen nach der akuten Phase einer Meningitis für Tage weiter niedrige Glucosespiegel trotz Verbesserung der klinischen Symptomatik und anderer Laborparameter (170).

Es gibt Hinweise darauf, daß bei Meningitis Transportprozesse der Blut-Hirn-Schranke beeinträchtigt werden und deswegen bestehende Konzentrationsgradienten sich verändern, was z. B. bei der Antibiotikatherapie von Bedeutung ist. Solche Störungen werden auch als Ursache für das Auftreten niedriger Liquorglucosespiegel diskutiert, neben der Möglichkeit einer verstärkten Glykolyse bei entzündlichen Erkrankungen des ZNS (58).

Inwieweit ein gestörter Transport oder verstärkter Katabolismus für niedrige PLP-Werte bei Meningitiden verantwortlich sein können, läßt sich mit den vorhandenen Befunden nicht abschätzen. Auch wenn mit diesen Daten keine Aussage über einen eventuellen ursächlichen Zusammenhang zwischen niedrigen Liquor-PLP-Spiegeln und anderen Veränderungen bei Meningitis möglich ist, werden doch bei einigen Patienten die klinischen Befunde, die Ausdruck einer schweren Störung des ZNS sind (wie z.B. die Krampfanfälle, die als prognostisch ungünstiges Zeichen gelten), durch die auffällig niedrige Liquor-PLP-Konzentration wiedergespiegelt. Möglicherweise läßt sich dies durch Verlaufsmessungen erhärten, obwohl der Befund nur als Hinweis auf andere weitreichende Störungen des Substanzhaushalts des ZNS gewertet werden kann.

Fallbeschreibungen

S.F.: Der 4 1/2 Monate alte Säugling entwickelte 6 Tage nach einer fieberhaften Erkältung hohes Fieber und zeigte tonisch-klonische Krampfanfälle. Bei der Aufnahme wurden neben diesen Krämpfen eine Parese der rechten Körperhälfte, verlangsamte Lichtreaktion der Pupillen und eine Deviation der Bulbi nach rechts festgestellt.

Die Liquorpunktion ergab: Protein 440 mg %, Zellen 615, Glucose 0,4 mg %, PLP: unterhalb der Nachweisgrenze. Es wurden massenhaft Pneumokokken

nachgewiesen. Eine Kontrollpunktion 24 Stunden später ergab 760 Zellen, Glucose 24 mg %.

Trotz sofortiger Antibiotikabehandlung verschlechterte sich der Zustand des Säuglings rapide. 2 Tage nach der Aufnahme verstärkten sich die Krämpfe und gingen schließlich in einen Status epilepticus über. Die Krampfanfälle wurden mit Rivotril behandelt, ein EEG zeigte schwerste Allgemeinveränderungen im Sinne einer kortikalen Schädigung. Gleichzeitig entwickelte sich ein hämolytisch-urämisches Syndrom, wahrscheinlich aufgrund einer Neuraminidase-Produktion der Pneumokokken. Das Kind starb 8 Tage nach Aufnahme unter den Zeichen eines irreversiblen Hirntodes. Die Autopsie ergab, daß die Gyri des Kortex teilweise völlig aufgelöst waren und die weiße Marksubstanz sichtbar war.

M.M.: Der 4 1/2-jährige Junge erkrankte in der Folge einer hochfieberhaften Sinusitis an einer letal endenden Meningitis, in deren Verlauf folgende neurologische Symptomatik auftrat: Linksbetonter Krampfanfall, Halbseitensymptomatik links, Tetraspastik, Erregungszustände. Im EEG konnten keine Krampfäquivalente gefunden werden, jedoch Zeichen schwerer Funktionsstörungen.

Wie auch aus den Liquorwerten ersichtlich, rezidierte die Meningitis nach einer etwa 3 Wochen dauernden Remissionsphase. Klinisch war jedoch der Zustand zu jedem Zeitpunkt des Krankheitsverlaufs bedrohlich, das Kind war z.B. nie ansprechbar. Autopsisch konnten eine Abszeßbildung und Nekrosen am Gehirn festgestellt werden.

Verlauf der Liquorbefunde:

Krankheitstage :	1	3	5	10	21	25	32
Liquorbefunde:							
Protein (mg%)	380	277	242	359	131	91	745
Zellzahl	13000	6400	745	345	30	6	4200
Glucose (mg%)	10	12	16	33	49	54	3
<u>PLP (ng/ml)</u>						<u>0,2</u>	

Der zur Messung des PLP-Gehalts erhaltene Liquor wurde also während der Remissionsphase abgenommen.

W.T.: Siebenjähriger Junge. Hämophilus-Influenzae-Meningitis, Eintritts-
pforte Lunge. Das Kind war während des kurzen Verlaufs bewußtlos, rea-
gierte nicht auf Schmerzreize. Es bestand ein erhöhter Hirndruck. Einen
Tag vor der Liquorpunktion, deren Ergebnis unten angegeben ist, zeigte
ein EEG das Bild des Hirntodes. Autopsisch wurde eine granulozytäre Me-
ningitis ohne Hinweise auf Veränderungen im Sinne einer Enzephalitis
festgestellt.

Liquorbefund: Protein 1550 mg %, Zellzahl 9600, Glucose 195 mg %,
PLP 0,3 ng/ml (Plasma-PLP 4,0 ng/ml).

H.F.: 1 1/2 Monate alter Säugling. Im Verlauf einer Gastroenteritis
trat ein Krampfanfall auf. Die daraufhin durchgeführte Liquorpunktion
ergab folgende Befunde: Zellzahl 14.000, Glucose 15 mg %, Gramnega-
tive Keime (als Hämophilus influenzae identifiziert).

Das Kind war während der akuten Phase der Meningitis bewußtlos und rea-
gierte nicht auf Schmerzreize, es wurden jedoch weiter tonisch-klonische
Krämpfe beobachtet, die durch Phenhydan zu beseitigen waren. Das EEG
zeigte anfallsspezifische Veränderungen und eine Befundbesserung nach
Phenhydan-Therapie. Im CT wurde ein erweitertes Ventrikelsystem festge-
stellt.

Liquorbefunde:

Krankheitstage :	1	2	7	17
------------------	---	---	---	----

Liquorbefunde:

Protein (mg%)		272	280	140
Zellzahl	14000	11500	70	130
Glucose (mg%)	15	9	8	30
<u>PLP (ng/ml)</u>		<u>3,8</u>		

K.S.: Das 1 3/4 Jahre alte Mädchen war wegen eines Hydrozephalus bei
inoperablem (teilreseziertem) Gehirntumor mit einem Ventil versorgt
worden. Nach einer Reimplantation des Ventils stellten sich Wundhei-
lungsstörungen ein. In einem Wundabstrich war ein Pseudomonaskeim
nachgewiesen worden. Da außerdem Fieber um 39° C auftrat und das
Kind erbrach, wurde eine Liquorpunktion durchgeführt. Befund: Zellzahl
900, Protein 116 mg %, PLP 1,6 ng/ml.

Mit hochdosierten Antibiotikagaben und Auswechseln des Ventilsystems
konnte die Situation unter Kontrolle gebracht werden.

H.D.: Gesicherte Meningitis. Keine weiteren Angaben greifbar.

K.H.: 15-jähriger Junge. Es lag eine Hämophilus-Meningitis vor. Bei der Erstpunktion fand sich: Protein 608 mg %, Zellzahl 617, Glucose 6 mg %. Kontrollpunktion 5 Tage später: Protein 90 mg %, Zellzahl 322, Glucose 54 mg %, PLP unterhalb der Nachweisgrenze. Wie auch beim Patienten M.M. fand sich hier ein sehr niedriger Liquor-PLP-Wert bei wieder normalisierter Liquorglucose.

H.G.: Das cerebral geschädigte Kind mit einem Anfallsleiden wurde wegen einer Meningokokkensepsis mit Meningitis aufgenommen.

Neben der schweren Allgemeinsymptomatik mit massivem Schock, disseminierten Hautblutungen und passagerem Nierenversagen bestanden bedrohliche cerebrale Symptome: Das Kind erlitt einen Status epilepticus, der mit Luminal und Phenytoin behandelt wurde. Es war stupös, zeigte keine Pupillenreaktion auf Licht. Im EEG fanden sich Zeichen einer erhöhten Anfallsbereitschaft über der linken Hemisphäre. Auch 3 Monate später war diese Symptomatik kaum gebessert. Es lag eine Tetraspastik, verminderte Spontanmotorik und fehlende Pupillenreaktion vor.

Im Gegensatz zu der klinischen Symptomatik zeigten die Liquorbefunde ein weniger schweres Bild: Bei der Erstpunktion fanden sich 27 Zellen, Protein 38 mg %, Glucose 68 mg %, PLP 4,8 ng/ml. Eine Kontrollpunktion ergab 5 Zellen, Protein 85 mg %, PLP 9,5 ng/ml.

K.C.: Bei dieser erwachsenen Patientin lag eine zum Zeitpunkt der ersten Liquorpunktion schon in Remission begriffene Meningoenzephalitis ohne Erregernachweis vor. Die Symptomatik bestand in Cephalgien, Gangunsicherheit, Zitterigkeit, neurasthenischen Beschwerden und Hörminderung. Der Verlauf stellte sich anhand der Liquorbefunde folgendermaßen dar:

Zeitverlauf :	12.12.	5.1.	31.1.	29.3.	26.7.	8.1.
Liquorbefunde:						
Protein (mg%)	455	53	391	76	39	44
Zellzahl	687	81	0	3	39	30
Glucose (mg%)	13	68	40	35	50	
PLP (ng/ml)	10,9			2,4		
Plasma-PLP(ng/ml)	39,0			12,5		

Das Zellbild im Liquor wurde als das bei einer subakuten uncharakteristischen Entzündung beschrieben. Im Hinblick auf die Liquorelektrophorese wurde die erhöhte autochthone IgG-Produktion hervorgehoben. Im Gegensatz zu den Patienten mit hochakuten Meningitiden fand sich bei diesem Verlauf bei der Erstpunktion eine sehr hohe Liquor-PLP-Konzentration, allerdings bei gleichzeitig hohem Plasma-PLP-Spiegel und erhöhtem Liquorprotein. Der Liquor-PLP-Spiegel schien in diesem Fall parallel mit den übrigen Liquorparametern im Verlauf der Remission zum Normalwert zurückzukehren.

7.6.5.2 Hydrocephalus

Bei Patienten mit Hydrocephalus wurden in der Regel bei erhöhten Liquor-proteinspiegeln auch erhöhte Liquor-PLP-Konzentrationen gefunden. Bei einem Patienten mit sehr niedrigem Liquorprotein war ein ebenfalls kleiner PLP-Wert vorhanden, was den Zusammenhang unterstützt.

Eine Korrelation von extrem hohem PLP- und Proteingehalt fand sich auch bei einem Kind mit cerebralen Metastasen eines Leberzellcarcinoms und Hydrocephalus occlusus.

Bei mehrfachen Messungen an ein- und demselben Patienten konnten allerdings keine parallelen Verläufe der Protein- und PLP-Konzentrationen im Liquor gefunden werden. Vergleicht man die Liquor-Werte von Protein und PLP verschiedener Patienten untereinander, findet man jedoch eine Korrelation in der Größenordnung der Meßwerte. Beispielsweise fanden sich bei jeweils mehreren Messungen an drei Patienten folgende Werte:

Pat. P.D.:	n = 3	Protein: 322 ± 253 mg %	PLP: $16,8 \pm 10,0$ ng/ml
Pat. K.S.:	n = 2	Protein: 109 ± 91 mg %	PLP: $4,7 \pm 0,7$ ng/ml
Pat. K.P.:	n = 2	Protein: 139 ± 19 mg %	PLP: $5,2 \pm 2,9$ ng/ml

Unter den Hydrocephaluspatienten gab es einige Fälle, bei denen sich verschiedene Einflußgrößen auf den Liquor-PLP-Spiegel zu überlagern schienen. Ein Patient wies bei einem mäßig erhöhten Liquorproteinspiegel einen sehr hohen Liquor-PLP-Wert auf, es bestand gleichzeitig ein hoher Plasma-PLP-Spiegel, was den Befund erklären könnte.

Bei einem anderen Kind fand sich bei erhöhtem Liquorprotein ein relativ niedriger PLP-Wert. Möglicherweise ist dies durch das Vorhandensein einer Pleocytose bei Bakteriennachweis im Liquor zu erklären.

In diesem Zusammenhang wäre es interessant, festzustellen, wie sich die PLP-Spiegel im Liquor bei den verschiedenen Ätiologien des Hydrocephalus verhalten, also bei Obstruktion der Zirkulation oder Absorptionsstörung an den Arachnoidalvilli. Die Einflüsse werden sich dabei nicht immer streng auseinanderhalten lassen, da z.B. auch bei Obstruktion durch Tumoren zugleich eine Absorptionshemmung durch Substanzen hervorgerufen werden kann, die durch den Tumor freigesetzt werden (58).

Auch bei Subarachnoidalblutungen und posthämorrhagischem Hydrocephalus wird die Blockierung von resorbierenden Strukturen durch Blutbestandteile verantwortlich gemacht (58).

7.6.5.3 Patienten mit Krampfsymptomatik

Infektkrämpfe

Bei Kindern mit Infektkrämpfen wird aus verschiedenen Gründen eine konstitutionelle Prädisposition für die Entwicklung von Krampfanfällen vermutet:

- a) Sie treten familiär auf.
- b) Bei Kindern mit Fieberkrämpfen ist die Inzidenz von Epilepsien weit größer als bei normalen Kindern.
- c) Ein Drittel der Kinder, die einen Fieberkrampf erlitten, wird weitere bekommen.

Es gibt deswegen ein Interesse an etwaigen Stoffwechselstörungen solcher Kinder. Untersuchungen hierzu schließen auch Arbeiten über den Vitamin B 6-Stoffwechsel mit ein.

Careddu et al. fanden unmittelbar nach Auftreten von Fieberkrämpfen pathologische Tryptophanbelastungstests bei einigen Kindern (29). Die Frage, ob man daraus einen Nutzen von Pyridoxingaben für die Verhinderung weiterer Infektkrämpfe ableiten könne, beantworteten McKiernan et al. (106). In einem kontrollierten klinischen Test verglichen sie eine Gruppe von Kindern, die nach einem Fieberkrampf mit zweimal täglich 20 mg Pyridoxin behandelt wurde, mit einer Kontrollgruppe, die nach einem Fieberkrampf mit zweimal täglich 25 mg Ascorbinsäure behandelt wurde. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Inzidenzen von weiteren Fieberkrämpfen innerhalb eines Jahres bei den beiden Gruppen. Die Autoren erachteten deshalb eine Störung des Vitamin B 6-Metabolismus als Ursache für Fieberkrämpfe für unwahrscheinlich. Sie zeigten außerdem, daß der Tryptophanbelastungstest auch bei Kindern mit febrilen Erkrankungen, aber ohne Fieberkrämpfe pathologisch sein kann.

Demgegenüber fanden Schmidt und Löscher bei Kindern mit Fieberkrämpfen signifikant verminderte Konzentrationen von GABA im Liquor (129).

Die in unserer Untersuchung gezeigten Ergebnisse lassen keine Auffälligkeiten des Liquor- und Plasmagehalts von PLP bei solchen Patienten erkennen. Auch die Liquorproteinwerte liegen im Normalbereich.

	Alter	Liquor-PLP	Plasma-PLP	Liqu.-Prot
Patienten	4W < x < 1J	4,2 ± 1,4ng/ml	11,4 ± 1,6ng/ml	26,6 ± 9,4mg%
	x ≥ 1J	3,6 ± 1,7ng/ml	12,7 ± 5,8ng/ml	21,5 ± 10,1mg%
Kontrollen	4W < x < 1J	4,6 ± 2,1ng/ml	11,1 ± 7,5ng/ml	35 ± 15 mg%
	x ≥ 1J	3,0 ± 1,5ng/ml	11,9 ± 9,3ng/ml	35 ± 15 mg%

Krampfanfälle verschiedener Ursache

Untersuchungen zum Vitamin B 6-Stoffwechsel bei Patienten mit verschiedenen neurologischen Symptomen und Therapieversuche mit Vitamin B 6 wurden einmalig in der Literatur beschrieben.

Bhagavan et al. (19) und Coleman et al. (37) untersuchten die Wirkung von Pyridoxin auf die Blut-Serotonin und Blut-PLP-Konzentration sowie die klinische Symptomatik bei Kindern mit hyperkinetischem Syndrom.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Syndrom und Vitamin B 6 ergibt sich aus dem Faktum, daß der Blutgehalt an Serotonin, zu dessen Biosynthese PLP benötigt wird, bei Kindern mit hyperkinetischem Syndrom signifikant erniedrigt ist.

Bhagavan et al. fanden andererseits den Blut-PLP-Spiegel bei solchen Patienten auch im Normbereich.

Therapieversuche mit Pyridoxin waren trotzdem erfolgreich. In einem Doppelblindversuch zum Vergleich der Wirkung von Pyridoxin und Methylphenidat beurteilten die Eltern und Lehrer von hyperkinetischen Kindern anhand einer Skala von 10 Merkmalen das Verhalten der Kinder. Sowohl Pyridoxin als auch Methylphenidat verbesserten die Symptomatik wirksamer als Placebo, wobei Pyridoxin sogar als noch etwas effektiver als Methylphenidat angesehen wurde. Die Blut-Serotoninspiegel waren nach Pyridoxingabe erhöht, nach Methylphenidat nicht.

Auch bei anderen neurologischen Syndromen wurden mit Pyridoxin Erfolge erzielt. Ernsting und Ferwerda (57) sahen bei 8 von 14 Patienten im Alter von 2 bis 17 Jahren, die an petit-mal-Anfällen litten, Verbesserungen nach Pyridoxindosen von 60 - 120 mg/die.

In einer detaillierten Studie untersuchten Hagberg et al. (68) die PLP-Konzentration im Plasma bei epileptischen Kindern und führten Tryptophanbelastungstests durch. Sie wählten folgende Einteilung der Patienten nach diagnostischen Kriterien:

- a) "Exogene Epilepsie" bei chronischen Hirnschäden nach perinatalen Komplikationen, kranialem Trauma, Hirntumor etc.
- b) "Progressive Gehirnerkrankungen". Hierunter fielen hereditäre Ataxie, Phenylketonurie, Leukodystrophie, Neurolipidosen und andere degenerative Gehirnerkrankungen.
- c) "Kryptogene Epilepsien".

Gegenüber Kontrollpersonen konnten die Autoren bei Gruppe A und B keine signifikanten Unterschiede der Plasma-PLP-Konzentration und der Xanthurensäureausscheidung beim Tryptophanbelastungstest feststellen. Bei der Grup-

pe der kryptogenen Epilepsien war ebenfalls die Plasma-PLP-Konzentration unauffällig, aber der Tryptophanbelastungstest bei 60 % dieser Patienten pathologisch. Er konnte durch Pyridoxingabe normalisiert werden, wobei dann erhöhte Plasma-PLP-Spiegel vorlagen. Hagberg et al. fanden aber keine Gemeinsamkeiten in der Symptomatik dieser Kinder und konnten auch keine einheitlich positive Reaktion auf Therapieversuche mit Vitamin B 6 feststellen. Vielmehr standen Fällen, die sehr gut auf die Therapie ansprachen, solche gegenüber, bei denen auf Pyridoxingabe sogar eine Verschlechterung der Symptomatik auftrat.

Im einzelnen fand sich positive Reaktion auf Pyridoxin nur bei Kindern, die einen pathologischen Tryptophanbelastungstest aufwiesen. Hierunter war ein Patient mit Grand-Mal-Anfällen und Hyperaktivität, 3 Kinder im Alter von 13 bis 14 Jahren mit psychomotorischen Anfällen und 10 weitere Kinder, bei denen eine teilweise Besserung bzw. Verbesserung des mentalen Status eintrat.

Bei einem Kind, das mit Pyridoxingabe häufiger Krampfanfälle erlitt als ohne, lag allerdings ebenfalls ein pathologischer Tryptophanbelastungstest vor. In einem weiteren Fall trat nach Pyridoxin eine Verschlechterung des EEG-Befunds bei klinischer Besserung ein.

Der Nutzen einer Pyridoxintherapie bei Anfallsleiden verschiedener Ursache ist umstritten. Versuche bei Kindern mit BNS-Krämpfen wurden teilweise mit Erfolg durchgeführt. French et al. (59) fanden bei einigen solchen Patienten Besserungen der Krampfsymptomatik, des Verhaltens und des mentalen Status.

Bei BNS-Krämpfen wie auch anderen Formen von Krampfanfällen zeigte sich jedoch, daß bei Fällen, in denen der Tryptophanbelastungstest pathologisch war, dieser zwar durch Pyridoxingaben normalisiert wurde, die Wirkung auf die klinische Symptomatik jedoch in fast allen Fällen enttäuschend war. In diesem Zusammenhang ist es auch interessant, daß der Tryptophanbelastungstest z.B. durch Kortikosteroide normalisiert wird. Diese zeigen aber in der Regel einen besseren therapeutischen Effekt auf Krampfanfälle als Vitamin B 6, ohne dessen Konzentration im Organismus zu erhöhen (24).

Bower resümierte dies dahingehend, daß die Möglichkeiten, die Verfügbarkeit von Vitamin B 6 für den Gesamtorganismus festzustellen wie z.B. der Tryptophanbelastungstest, nicht unbedingt für den cerebralen Metabolismus relevant sein müssen. Vielmehr wären andere Methoden zur Beurteilung der cerebralen Verfügbarkeit von Vitamin B 6 notwendig, bevor dessen Rolle bei der Verhinderung von Anfällen geklärt werden könne (24).

Zu den Fallbeschreibungen

Die offensichtliche Heterogenität der hier zur Beobachtung gelangten Fälle und ihre noch geringe Zahl läßt eine Bewertung der Ergebnisse nur schwer zu. Es wurde vorläufig so verfahren, die einzelnen Fallbeschreibungen, soweit greifbar, mit den Liquorbefunden anzugeben. Die Gruppierung entspricht derjenigen, die in den Tabellen des Kapitels 7.5.6 gewählt wurde.

Prospektiv wäre in diesem Zusammenhang interessant, bei größeren Patientenzahlen verschiedene Befunde auf ihren Einfluß auf die Liquor-PLP-Konzentration zu testen. Bergman et al. (15) zeigten z.B., daß folgende Befunde einen Voraussagewert für den Verlauf und die spätere neurologische Entwicklung nach neonatalen Krämpfen hatten: 1) Tonische Krämpfe, die im Allgemeinen auf strukturelle Hirnschäden hindeuten; 2) Später Beginn von Krampfanfällen; 3) Häufige Anfälle.

Von Interesse könnte hier auch sein, ob die wohl häufigsten Ursachen für neonatale Krämpfe, der hypoxisch-ischämische Insult und das intracerebrale Hämatom eine sekundäre Änderung des PLP-Spiegels hervorrufen oder ob eine solche Wirkung generell bei cerebralen Krämpfen eintritt.

Beispielsweise wurde bei zwei der hier beschriebenen Patienten, die innerhalb der Gruppe mit symptomatischen Anfällen die wohl schwersten Hirnschäden aufwiesen, bei jeweils 2 Bestimmungen auffällig niedrige Liquor-PLP-Spiegel gefunden.

Symptomatische Krampfanfälle

S.M.: Frühgeborenes der 32. SSW. Bei dem Kind bestand schon am ersten Lebenstag Krampfbereitschaft, der mit Phenobarbital und Diazepam entgegengewirkt wurde. Am 16. Lebenstag fiel eine Neigung zu Kloni auf. Trotz antikonvulsiver Behandlung nahmen die multifokalen Anfälle sowie eine Neigung zu Apnoen zu. Ein Versuch mit Rivotril brachte keine Besserung, Phenhydan im Tropf (5 mg/kg/die) führte zu vermehrt auftretenden Myoklonien, aber selteneren Cyanoseanfällen.

Sonographisch konnte am 5. Lebenstag eine intracerebrale Blutung mit Einbruch in den rechten Seitenventrikel und Ventrikelerweiterung festgestellt. 17 Tage später fand man das Bild eines hochgradigen posthämorrhagischen Hydrocephalus internus.

Wegen Zunahme der Ventrikelweite wurde eine Lumbalpunktionsbehandlung eingeleitet, bei der jeden 2. Tag zwischen 8 und 25 ml Liquor abpunktiert wurden. Bei der 2. Punktion (20 ml Liquor) fand sich:

PLP 3,6 ng/ml (Plasma-PLP 23,1 ng/ml); Protein 208 mg %; Glucose 72 mg %. Die Symptomatik änderte sich innerhalb eines Zeitraums von 3 Monaten nur wenig. Vitamin B₆-Gabe wurde nicht versucht.

Neben der oben beschriebenen Symptomatik bestanden noch schwere zentrale Tonus- und Koordinationsstörungen.

D.T.: Diagnosen: Cerebrales Anfallsleiden bei v.a. perinatale Hirnschädigung. Zentrale Koordinationsstörung mit rechtsseitig reduzierter Spontanmotorik, Haltungs- und Bewegungsasymmetrie.

Ab dem 3. Lebensmonat begannen tonisch-klonische Anfälle mit Cyanose und Deviation der Bulbi, die jeweils einige Minuten dauerten. Diazepam brachte keine Besserung, nach Phenobarbital sistierten die Krämpfe am 2. Tag. Ein während eines Anfalls abgeleitetes EEG zeigte bilateral generalisierte hypersynchrone Entladungen. Ein Kontroll-EEG nach Einleitung der Behandlung war unauffällig, ebenso das Schädel-CT und-Sonogramm und die Aminosäurenausscheidung im Urin.

Eine während der Phase mit Krampfanfällen abgenommene Liquorprobe ergab folgende Befunde: Protein 40 mg %; Zellzahl 9; Glucose 52 mg %; PLP 3,3 ng/ml.

Da bei dem Kind kein Hinweis auf eine metabolische Störung oder eine Raumforderung vorhanden war, jedoch bei der Geburt eine vorzeitige Plazentalösung, teilweise infarzierte Plazenta und ein echter Nabelschnurknoten vorlag, wurde auf eine perinatale hypoxisch-ischämische Hirnschädigung geschlossen.

B.J.: Reifes Neugeborenes, das wegen Trinkschwäche, muskulärer Hypertonie und schweren Tonus- und Koordinationsstörungen auffiel. Es wurde ein intracerebrales Hämatom Grad I links diagnostiziert. Das EEG war altersentsprechend, ohne hypersynchrone Potentiale. Am 9. Lebenstag wurde eine zeitweise hypertone Körperhaltung festgestellt, mit Strecktonus der unteren Extremitäten und Opisthotonus. Diese Symptomatik verstärkte sich bis zu einem ausgeprägten Hypo-Hyperkinetischen Syndrom. Am 22. Lebenstag stellten sich Krampfzeichen ein und einen Tag später traten tonische Krampfanfälle der unteren Extremität auf, mit kurzfristigen Apnoen und ausgeprägten Bradykardien (um 70). Die Laborwerte, insbesondere Glucose, Calcium, Magnesium waren hierbei unauffällig. Die Liquoruntersuchung ergab einen PLP-Spiegel von 0,4 ng/ml, im übrigen unauffällige Befunde. Die Behandlung erfolgte mit Phenobarbital 30 mg/die sowie Pyridoxin 50 mg/die für 2 Tage. Die Symptomatik verbesserte sich jedoch nicht. Nach 5 Tagen wurde die Phenobarbitalgabe auf 45 mg/die erhöht. Die Krampfsymptome besserten sich langsam, am 33. Lebenstag traten keine Bradykardien mehr auf, der Säugling war jedoch hypoton, trinkschwach, die Lagereaktionen waren nur angedeutet, außerdem wurden fast fehlende Kopfkontrolle und geringe Spontanmotorik gefunden. Nach dem 34. Lebenstag wurden keine Krämpfe mehr beobachtet, eine Pyridoxintherapie mit 20 mg/die vom 37. bis zum 47. Lebenstag zeigte keinen Effekt auf die noch bestehende Symptomatik. Eine Liquorpunktion am 51. Tag ergab einen PLP-Spiegel von 0,8 ng/ml. (Plasma-PLP 12,0 ng/ml).

Die Barbiturattherapie wurde am 74. Tag abgesetzt. Es traten keine Krämpfe mehr auf, auch im übrigen war der neurologische Befund unauffällig, bis auf den Strecktonus der unteren Extremitäten. Der Kopfumfang war an der Grenze zur Mikrocephalie, das Schädel-CT wies auf eine Hirnreifungsstörung hin.

B.T.: (Früh-)mangelgeborenes Kind (37.SSW). Mekonium-Aspiration, Perinatale Asphyxie. Es lag bei diesem Neugeborenen eine Embryophetopathie mit multiplen Mißbildungen vor (Klumpfüße, Fingerkontrakturen, Leistenhernie, BWS-Skoliose). V.a. Alkoholembyopathie.

Neuroanatomische Befunde: Verplumpung der Seitenventrikel, Dandy-Walker-Cyste mit zunehmender Raumforderung, Markreifungsstörung und corticale Atrophie mit innerhalb eines Zeitraums von 3 Monaten zunehmender Rarefizierung der Gehirns substanz.

Bei dem Neugeborenen wurde schon am 1. Lebenstag Hyperexcitabilität festgestellt, außerdem ungerichtete Motorik mit Tonuserhöhung und Opisthotonus sowie Neigung zu Spontankloni. Es wurden jedoch außer der Hyperkinese weder Krampfanfälle noch klinisch verifizierbare Krampfäquivalente festgestellt. Während dieser Zeit wurde mit Phenobarbital behandelt.

Ein erster schwerer Krampfanfall mit generalisierter Cyanose und Tachykardie konnte durch eine Chloralhydrat-Rectiole beseitigt werden. Es folgten jedoch weitere Anfälle mit Ateminsuffizienz, so daß der Säugling intubiert werden mußte. Trotz Rivotril- und Phenhydanthherapie konnte keine Besserung festgestellt werden. Es wurde eine Hirnödemprophylaxe durchgeführt.

Eine Liquorpunktion 18 Tage nach dem ersten Krampfanfall ergab folgende Befunde: Protein 57 mg %; Zellzahl 2; Glucose 71 mg %; PLP 0,8 ng/ml. (Plasma-PLP: 24,1 ng/ml).

Wegen der Wirkungslosigkeit der Phenhydanthherapie wurde mit Ergenyl in steigender Dosierung begonnen, jedoch ohne durchgreifende Besserung. Bei einer Kontrollpunktion vier Wochen nach der Erstpunktion fand man: Protein 61 mg %; Zellzahl 9; Glucose 55 mg %; PLP 0,2 ng/ml (Plasma-PLP 30,6 ng/ml).

7 Tage vor dieser Punktion war mit ACTH 20 I.E. i.m. begonnen worden, das auf 35 I.E. gesteigert wurde. Am Tag der Kontrollpunktion wurde mit 20 mg Pyridoxin/die begonnen, das dauernd beibehalten wurde.

Es war nun festzustellen, daß etwa 2 Wochen nach Beginn der ACTH-Therapie und ca. 1 Woche nach der ersten Pyridoxingabe ein krampffreies Intervall eintrat, jedoch nach Absetzen der ACTH-Therapie wieder Krämpfe auftraten, trotz Beibehaltung von Pyridoxin. Außerdem hatte weder ACTH noch Pyridoxin eine prompte Besserung der Symptomatik bewirkt.

Wegen einer sich entwickelnden Pneumonie wurde die ACTH-Therapie abgesetzt. Der Säugling wurde antibiotisch behandelt, wurde jedoch ateminsuffizient und mußte intubiert werden. Es kamen eine kardiale Insuffizienz und erneute schwere Krampfanfälle hinzu. Das Kind verstarb in der 19. Lebenswoche im irreversiblen Schock.

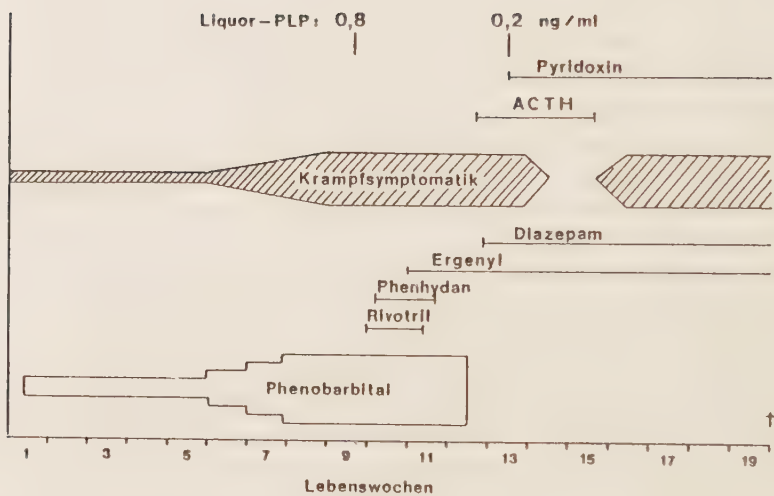


Abb 38 : Therapieschema für Patient B.T.

K.T.: BNS-Krämpfe, V.a. cerebrale Bewegungsstörung (muskuläre Hypertonie bzw. Spastik).

R.J.: Diagnosen: Spastische Hemiplegie links, cerebraler Krampfanfall. Das 3 Jahre alte Kind erlitt einen tonisch-klonischen Krampfanfall, war dabei nackensteif, kurze Zeit nach 10 mg Valium i.v. wieder ansprechbar und orientiert.

Die Liquorpunktion ergab folgende Werte: Protein 25 mg %; Zellzahl 1; PLP 4,6 ng/ml (Plasma-PLP 11,1 ng/ml).

Das EEG zeigte einen zur Hemiparese links passenden Befund mit Funktionsstörungen und Zeichen für Anfallsbereitschaft über der rechten Hemisphäre. Nach diesem ersten Krampfanfall wurde das Kind noch nicht auf eine Dauertherapie mit Antiepileptika eingestellt.

A.K.: Diagnosen: Akute lymphatische Leukämie, Krampfanfälle.

Das 7 1/2 Jahre alte Kind wurde unter anderem mit Methotrexat intrathecal und Ultralan oral behandelt. 4 Tage nach der ersten Cytostatikagabe trat ein Krampfanfall auf. Es wurde anhand des CT der V.a. eine Blutung im rechten Hemisphärenbereich geäußert (es bestand eine ausgeprägte Hypertonie). Im EEG fanden sich Zeichen von Funktionsstörungen über der rechten Hemisphäre. In einer Liquorprobe wurden Protein 19 mg %; PLP 1,4 ng/ml gefunden.

Die Behandlung der Krampfanfälle wurde mit Phenhydan und Luminal durchgeführt.

C.V.: Bei dem 1 1/2 jährigen Jungen bestand ein frühkindlicher Hirnschaden mit schwerer cerebraler und motorischer Retardation. Außerdem traten BNS-Krämpfe auf. Die stationäre Aufnahme erfolgte wegen einer Bronchitis. Die Liquorpunktion ergab: Protein 12 mg %; PLP 1,3 ng/ml und auch ansonsten unauffällige Werte. Im EEG fanden sich dabei Zeichen latenter Anfallsbereitschaft und vereinzelte Hypsarrhythmiezeichen. Während der Dauer des stationären Aufenthalts traten jedoch keine Krämpfe auf.

Krampfanfälle unklarer Genese

P.S.: Frühgeborenes der 35.SSW. Es lag eine Fruchtwasseraspiration vor, außerdem eine Conjunctivitis purulenta. Es bestand der V.a. eine septische Allgemeininfektion, Blutkulturen waren jedoch steril.

Auffällig waren Neugeborenenkrämpfe am 3. und 5.Lebenstag bei sonstiger allgemeiner muskulärer Hypotonie, die mit Cyanose und Tachykardie einhergingen und nur kurz dauerten. Eine Liquorpunktion nach Auftreten des ersten Krampfereignisses erbrachte folgende Befunde: Protein 139 mg%; Zellzahl 9.

Beim zweiten Auftreten von Krämpfen am 5. Lebenstag fand sich im Liquor: Protein 114 mg %; Zellzahl 16; PLP 3,7 ng/ml; (Plasma-PLP 2,2 ng/ml).

Blutglucose und Blutgase waren dabei unauffällig. Im CT fanden sich Hinweise auf eine Markreifungsstörung und eine Erweiterung der Seitenventrikel. Die Krämpfe waren mit Rivotril und Luminal beherrschbar. Bis zum 26. Lebenstag wurde keine Krampfsymptomatik mehr beobachtet.

Auch bei diesem Frühgeborenen fällt das bei der Kontrollgruppe beobachtete Auftreten eines höheren Liquor- als Plasma-PLP-Gehaltes auf.

A.M.: Frühgeborenes der 35. SSW. Spontangeburt bei Hydrammion. Ileum-atresie bei Volvulus.

Erster Krampfanfall am 13. Lebenstag, im weiteren Verlauf noch 3 weitere Anfälle mit Pfötchenstellung der Hände, Hypersalivation, Deviation der Bulbi; Dauer jeweils ca. 10 Minuten.

Im Liquor zum Zeitpunkt des ersten Krampfanfalles fand sich: Protein 70 mg %; Zellzahl 3; Glucose 43 mg %; PLP 7,0 ng/ml (Plasma-PLP 7,1 ng/ml). Das EEG zeigte keinen eindeutig anfallspezifischen Charakter, jedoch Funktionsanomalien. Das Schädelsonogramm war unauffällig.

Auch bei diesem Kind findet sich der im Vergleich zum Plasma-PLP relativ hohe Liquor-PLP-Wert, wie auch in der Kontrollgruppe der Frühgeborenen.

B.C.: Das Mädchen erlitt mit 9 1/2 Monaten zum ersten Mal Krampfanfälle eher tonischen Charakters, symmetrisch, von Cyanose, Deviation der Bulbi und Hypersalivation begleitet und ca. 2 - 3 Minuten Dauer. Am Tag der ersten Beobachtung traten noch drei weitere Krampfanfälle auf und an den beiden folgenden Tagen ebenfalls drei Krampfereignisse.

Die Therapie erfolgte mit Diazepam-Rectiolen und ergänzend B-Vitamin-komplex-Tropfen (1,5 mg Pyridoxin/die). Diese wurde nach 3 Tagen wieder abgesetzt. Das Kind blieb anfallsfrei und neurologisch unauffällig bis

30 Tage nach Therapieende. Während dieser Phase wurde eine Liquorpunktion vorgenommen (9 Tage nach Absetzen der Diazepam-BVK-Therapie). Es wurden 8,9 ng/ml PLP gefunden bei einer Plasmakonzentration von 23,1 ng/ml. Nach einem Monat traten wieder an 2 Tagen hintereinander Krämpfe auf, die klinisch das gleiche Bild wie die vorher beschriebenen Anfälle boten. Das EEG zeigte ein pathologisches Bild mit dysrhythmischer, zu langsamer Grundaktivität.

Die Therapie mit Desitin-Balium-Rectiolen und Einstellung mit Primidon (375 mg/die) sicherte dem Kind von da ab Krampffreiheit bis ca. 1 Jahr nach der ersten Beobachtung. Auch im EEG fand sich eine deutliche Verbesserung. Ein Therapieversuch mit Vitamin B 6 wurde nicht in Betracht gezogen.

F.: Das reife lebensfrische Neugeborene zeigte am 4. und 5. Lebenstag generalisierte Myoklonien im Schlaf, die mit 100 mg Luminal behandelt wurden. Die Laboruntersuchungen ergaben normale Befunde, Virustiter waren negativ. Der Liquor war unauffällig (Protein 140 mg %; keine PLP-Bestimmung). Das Urinaminosäuren-Chromatogramm zeigte einen Fleck in der Gegend von Taurin, wobei Verdacht auf ein Artefakt bestand. Unter Behandlung mit Luminaletten traten 5 Tage lang keine Krämpfe mehr auf, das EEG war jedoch deutlich abnorm mit Hypersynchronizität und sharp waves. Am 11. Tag kam es zu einem schweren tonisch-klonischen Krampfanfall, bei dem weder 10 mg Diazepam rektal, noch 5 mg Valium i.v. und 0,5 mg Rivotril Hilfe brachte. Erst weitere 0,5 mg Rivotril senkten den Muskeltonus. Hierauf wurden noch 50 mg Benadon i.m. gegeben. Luminaletten wurden beibehalten. Das Neugeborene blieb weiterhin krampfbereit, ein EEG am 3. Tag nach dem Krampfereignis war deutlich abnorm mit Krampfabläufen, das Kind war jedoch während der Ableitung des EEG's unauffällig, eher hypoton. Eine Liquorpunktion am 10. Tag nach dem Krampfanfall ergab einen PLP-Gehalt unterhalb der Meßgrenze, woraufhin Benadon 40 mg/die als Dauermedikation angesetzt wurde. Ein EEG einen Tag vor Beginn der B 6-Behandlung zeigte normale Wach- und spontane Schlafaktivität, eine Ableitung 10 Tage nach Beginn lediglich eine leichte Asymmetrie paramedian. Der Säugling war unter 2 x 1 Luminalette und 40 mg Benadon täglich in gutem Zustand, neurologisch o.B. bis auf leichte Zitterigkeit.

C.A.: Der 10 Monate alte Säugling war den Eltern schon einen Monat vor Aufnahme wegen Zittern und Verkrampfung aufgefallen. Grund für die Einweisung war ein Krampfereignis, bei dem das Kind an Händen und Füßen zitterte und cyanotisch wurde. Die Liquorpunktion am Tag der Aufnahme ergab unauffällige Befunde (keine PLP-Bestimmung). Das EEG ergab zu diesem Zeitpunkt und auch später keinen Hinweis auf Entladungstätigkeit.

Es wurde eine beginnende Pneumonie sowie eine Angina tonsillaris festgestellt.

Sieben Tage nach Aufnahme wurde im Liquor einer Kontrollpunktion der PLP-Gehalt zu 0,8 ng/ml bestimmt. Der Plasma-PLP-Gehalt zum gleichen Zeitpunkt war 13,2 ng/ml.

Es konnte im weiteren Verlauf kein Krampfanfall beobachtet werden, eine neurologische Kontrolluntersuchung 9 Tage nach der Aufnahme zeigte jedoch eine deutliche motorische Retardierung.

Der naheliegende Verdacht auf einen Fieberkrampf wurde wegen des anamnestischen Hinweises auf frühere ähnliche Ereignisse etwas entkräftet. Letztlich wurde in diesem Fall das Vorliegen eines Affektkrampfes als wahrscheinlich angesehen.

A.A.: Sieben Monate alter Säugling. Diagnosen: Therapierefraktäre BNS-Krämpfe, spastische Tetraparese, ausgeprägte psychomotorische Retardierung, Mikrocephalus.

Erste Krämpfe stellten sich im Alter von 3 Monaten ein, sie imponierten wie BNS-Krämpfe. Seit diesem Zeitpunkt war auch die psychomotorische Entwicklung verzögert. Die Krampfanfälle wurden mit Rivotril behandelt, beim Weglassversuch traten sie erneut auf, waren jedoch auch durch Diazepam therapierbar. Insgesamt war jedoch die Krampftätigkeit durch Antiepileptika nur schlecht beeinflussbar.

Eine Liquorpunktion ergab folgende Befunde: Protein 27 mg %; Zellzahl 1; Glucose 216 mg %; PLP 6,2 ng/ml; (Plasma-PLP 11,1 ng/ml).

Es konnte kein Hinweis auf das Vorliegen einer hereditären Stoffwechselerkrankung des ZNS gefunden werden, jedoch waren im CT Zeichen einer ausgeprägten Substanzminderung im Großhirnbereich erkennbar. Das EEG zeigte eine latente Anfallsbereitschaft und Zeichen einer schweren cerebralen Entwicklungsstörung.

Stoffwechselkrämpfe

B.N.: Das neugeborene Mädchen zeigte am 9. Lebenstag eine ausgeprägte Hyperirritabilität, Pfötchenstellung der Hände, positives Chvostek'sches Zeichen und verstärkte Muskeleigenreflexe.

Die Blutuntersuchung ergab erniedrigtes Calcium (1,54) und erhöhtes Phosphat. Außerdem war das Parathormon grenzwertig (niedrig) normal.

Die Liquorpunktion zeigte unauffällige Befunde: Protein 124 mg %; PLP 2,5 ng/ml; (Plasma-PLP 23,7 ng/ml).

Durch Calcium i.v. verschwanden sämtliche Symptome. Bei einer Kontrolluntersuchung fand man: Parathormon 213; Ca 2,6; Phosphat 2,5.

Es wurde die Diagnose "Transitorischer Hypoparathyreoidismus" gestellt.

K.Ö.: Das Kind wurde nach unauffälliger Schwangerschaft termingerecht geboren. Am 6. Lebenstag wurde ein Krampfanfall beobachtet mit Hypersalivation, Deviation der Bulbi und Cyanose. Nach diesem Anfall bestand weiterhin Krampfbereitschaft bei normalem EEG-Befund. Probatorische Gabe von Pyridoxin 100 mg/die für 2 Tage zeigte einen positiven Effekt: Die Krampfbereitschaft verschwand vollständig.

19 Tage nach diesen Vitamin B 6-Gaben wurde der PLP-Gehalt im Urin bestimmt. Er betrug 15,7 ng/ml, was innerhalb der Altersgruppe als hochnormaler Wert bezeichnet werden kann. Die Pyridoxingaben wurden nicht weitergeführt, da keine Krampfanfälle mehr auftraten.

Im Alter von 8 Wochen wurden erneut 2 Krampfeignisse von den Eltern beobachtet. Nach stationärer Aufnahme wurden leichte Veränderungen im EEG festgestellt, außerdem ein allgemeiner statomotorischer Entwicklungsrückstand. Eine weitere PLP-Bestimmung im Urin ergab einen Wert von 5,8 ng/ml, also einen Normalbefund.

7 Wochen später wurden auf Station zwei kurz hintereinander auftretende tonisch-klonische Krampfanfälle beobachtet. Daraufhin wurden 100 mg Pyridoxin i.m. gegeben und eine Rectiole Chloralhydrat. Die Symptome sprachen gut auf diese Behandlung an (das EEG entsprach nach dieser Medikation dem eines Tiefschlafs). Es wurde deswegen eine Dauerbehandlung mit Pyridoxin 40 mg/die eingeleitet, unter der keine Anfälle mehr auftraten, während weiterer 3 Wochen stationären Aufenthalts. Das EEG zeigte im Verlauf leichte Veränderungen.

4 Wochen nach Ende des letzten stationären Aufenthalts wurde das Kind erneut wegen eines hochfieberhaften Infekts aufgenommen. Eine hierbei vorgenommene Liquorpunktion ergab unauffällige Befunde. (PLP konnte nicht bestimmt werden). Drei EEG-Ableitungen im Verlauf von 10 Tagen

ergaben Normalbefunde, auch der klinische Befund gab keine Hinweise auf eine Krampfbereitschaft. Deshalb wurde Pyridoxin probeweise abgesetzt. Eine PLP-Bestimmung im Vollblut 5 Tage nach Beendigung der Pyridoxintherapie ergab einen Wert von 37,7 ng/ml, war also hoch normal.

8 Wochen später wurde erneut von den Eltern ein Kramp fzustand beobachtet. Die PLP-Bestimmung in einer am gleichen Tag abgenommenen Blutprobe (ohne B 6-Therapie) ergab 31,9 ng/ml.

Stationär wurde Unruhe, aber keine Krampfanfälle bemerkt. Wegen des pathologischen EEG's (dysrhythmische Grundaktivität, Delta-Wellen) wurde jedoch trotz des normalen Blut-PLP-Spiegels erneut mit Pyridoxin 100 mg i.m. begonnen. Am Tag nach dieser Initialdosis zeigte das EEG eine deutliche Befundbesserung. Es wurde deswegen mit Pyridoxin 40 mg/die oral fortgefahren. Weitere EEG's innerhalb eines Zeitraumes von 4 Wochen waren normal, trotz einer Pneumonie, die mit Antibiotika behandelt wurde.

5 1/2 Monate nach Entlassung traten im Verlauf eines fieberhaften Infekts wieder tonisch-klonische Krampfanfälle von etwa 15 Minuten Dauer auf. Das EEG war leicht verändert. Da stationär kein weiteres Ereignis beobachtet werden konnte, wurde die Pyridoxindosierung beibehalten.

Innerhalb eines Jahres nach diesem Ereignis traten noch zwei Mal im Verlauf von fieberhaften Infekten Krampfanfälle auf. Beim ersten Mal wurde die Pyridoxindosis auf 80 mg/die erhöht. 3 Tage später wurde PLP im Vollblut bestimmt. Die Konzentration betrug 94,6 ng/ml, war also erhöht. Beim zweiten Ereignis wurde der PLP-Spiegel noch vor Pyridoxingabe auf Station zu 60,0 ng/ml bestimmt.

Mit Pyridoxin 80 mg/die war das Kind, außer in den genannten Situationen, krampffrei, es bestand jedoch ein allgemeiner Entwicklungsrückstand.

Die beschriebene Symptomatik wurde im Sinne einer Vitamin B 6-Abhängigkeit gedeutet. Es konnte zwar nur einmal das Verschwinden von Krampfsymptomen nach Vitamin B 6 beobachtet werden, jedoch fand man wiederholt die Normalisierung des EEG und einer allgemeinen Übererregbarkeit durch Vitamin B 6. Auch der Beginn der Anfälle am 6. Lebenstag ist nicht untypisch.

Untypisch, aber eine Vitamin B 6-Dependenz nicht ausschließend ist die einmal beobachtete Latenz von 3 Wochen nach Absetzen von Pyridoxin bis

zum Wiederauftreten von Symptomen. Typisch wiederum ist, daß es sich offensichtlich um einen Geschwisterfall handelt. Ein Geschwister des Patienten wies eine noch ausgeprägter auf Vitamin B 6-Abhängigkeit deutende Symptomatik auf, mit mehrfach gescheiterten Absetzversuchen und prompter Besserung sowohl der klinischen Symptome als auch des EEG nach Pyridoxingabe.

Sollte in diesem Fall tatsächlich eine Vitamin B 6-Abhängigkeit vorliegen, würden die zum Vitamin B 6-Status erhobenen Befunde bekannte Ergebnisse unterstützen: Blutspiegel waren entweder normal oder nach Therapie in einem Maß erhöht, wie es auch bei Normalpersonen nach Pyridoxingabe zu erwarten wäre. Die Urinspiegel waren ebenfalls normal. Bestimmungen von PLP im Liquor cerebrospinalis waren bisher bei diesem Kind nicht möglich.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Eine Methode zur Messung von Pyridoxalphosphat (PLP) wird beschrieben. Ihr Prinzip ist radioenzymatisch. Radioaktiv markiertes Substrat (Tyrosin) wird durch ein PLP-abhängiges Enzym (Tyrosindecaboxylase) zu ebenfalls radioaktiv markiertem Tyramin umgewandelt. Substrat und Produkt werden durch Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Cellulose getrennt. Das Produkt wird durch Flüssigkeitsszintillation bestimmt. Diese Methode erlaubt eine große Anzahl simultaner Analysenansätze bei relativ geringem Zeitaufwand. Die Sensitivität konnte im Vergleich zu anderen radioenzymatischen PLP-Meßmethoden vergrößert werden.

Messungen von PLP im Vollblut und Urin wurden durchgeführt. Es fand sich eine Tendenz zu sinkenden PLP-Konzentrationen bei steigendem Lebensalter, die jedoch auf 95%-Niveau statistisch nicht signifikant war. Es bestand eine gute Korrelation zwischen dem Blut- und Urin-Gehalt von PLP.

Messungen von PLP im Liquor cerebrospinalis und Blutplasma zeigten eine gute Korrelation dieser Konzentrationen, wobei der Liquor-PLP-Gehalt etwa 1/4 des Plasmagehalts betrug. Sowohl im Liquor als auch im Plasma besteht ebenfalls die Tendenz zu sinkenden PLP-Spiegeln bei steigendem Lebensalter. Bei Frühgeborenen fanden sich in der Regel deutlich höhere Liquorwerte und niedrigere Plasmawerte als bei reifen Neugeborenen.

Bei sehr hohen Plasma-PLP-Konzentrationen bestand keine lineare Abhängigkeit mehr zwischen Liquor-PLP- und Plasma-PLP-Spiegeln.

Im Bereich normaler Liquorproteinkonzentrationen bestand keine Korrelation zwischen Liquorprotein und PLP. Andererseits fanden sich bei Frühgeborenen und Patienten mit Hydrocephalus bei hohen Liquorproteinspiegeln auch erhöhte PLP-Konzentrationen. Das Gegenteil traf auf einige Fälle mit purulenten Meningitiden zu. Hier bestanden extrem niedrige PLP-Spiegel bei teilweise extrem erhöhten Liquorproteinkonzentrationen.

Liquor-PLP-Spiegel bei Patienten mit Krampfanfällen wurden bestimmt:

Bei Patienten mit Infektkrämpfen fanden sich normale Liquor- und Plasma-PLP-Konzentrationen.

Bei zwei Kindern mit symptomatischen Krampfanfällen bei Hirnreifungsstörung und Dandy-Walker-Syndrom fanden sich niedrige Liquor-PLP-Spiegel, ebenso bei einem Kind mit cerebralen Krämpfen unklarer Genese.

Ein Patient, bei dem der Verdacht auf Vitamin-B6-abhängige Krampfanfälle bestand, zeigte normale Blut- und Urin-PLP-Spiegel.

9. LITERATUR

- 1 D.M. Abercrombie, D.L. Martin: Inhibition of pyridoxal kinase by the pyridoxal- γ -aminobutyrate imine. *J. Biol. Chem.*, 255, (1980), 79-84.
- 2 D.J.D. Adams, O.A. Bessey, D.R. Bussey, A.E. Hansen: Vitamin B6 Requirement in Relation to Convulsive Seizures in Infants. *Am. J. Dis. Child.*, 88, (1954), 623.
- 3 B.B. Anderson: Red Cell Metabolism of Vitamin B6. In: Vitamin B6: Metabolism and Role in Growth von G.P. Tryfiates (Hrsg.). Westport 1980.
- 4 B.B. Anderson, C.E. Fulford-Jones, J.A. Child, M.E.J. Bird, C.J.T. Bateman: Conversion of Vitamin B6 Compounds to active forms in the red blood cell. *J. Clin. Invest.*, 50, (1971), 1901-1909.
- 5 J.A. Bain, H.L. Williams: Concentrations of B6 Vitamers in tissues and tissue fluids. In: Inhibition in the nervous system and γ -Aminobutyric Acid von E. Roberts (Hrsg.). New York 1960, 275-293.
- 6 J.A. Bain, R.G. Wiegand: Hydrazide Convulsions and vitamin B6 analogues in mouse brain. *J. Pharmacol.*, 119, (1957), 131.
- 7 M.S. Bamji: Laboratory tests for the assessment of vitamin nutritional status. In: Vitamins in human biology and medicine von M.H. Briggs (Hrsg.). Boca Raton 1981
- 8 A. Bankier, M. Turner, I.J. Hopkins: Pyridoxine dependent seizures - a wider clinical spectrum. *Arch. Dis. Child.*, 58, (1983), 415-418.
- 9 C.F. Baxter: Some recent advances in studies of GABA metabolism and compartmentation. In: GABA in nervous system function von E. Roberts, T.N. Chase, D.B. Tower (Hrsg.). New York 1976
- 10 C.F. Baxter, E. Roberts: Gamma-aminobutyric acid and cerebral metabolism. In: The neurochemistry of nucleotides and amino acids von R.O. Brady, D.B. Tower (Hrsg.). New York 1960
- 11 C.F. Baxter, E. Roberts: Demonstration of thiosemicarbazide-induced convulsions in rats with elevated brain levels of γ -aminobutyric acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 104, (1960), 426-427.
- 12 A. Bayón, L.D. Possani, M. Tapia, R. Tapia: Kinetics of brain glutamate decarboxylase-interactions with glutamate, pyridoxal-5'-phosphate and glutamate-pyridoxal-5'-phosphate Schiff's base. *J. Neurochemistry*, 29, (1977), 519-525.
- 13 M. Bejsovec, Z. Kulenda, E. Ponca: Familial intrauterine convulsions in pyridoxine dependency. *Arch. Dis. Childh.*, 42, (1967), 201-207.
- 14 R. Benesch, R.E. Benesch, S. Kwong, A.S. Acharya, J.M. Manning: Labeling of hemoglobin with pyridoxal phosphate. *J. Biol. Chem.*, 257, (1982), 1320-1324.
- 15 J. Bergman, M.J. Painter, R.P. Hirsch, P.K. Crumrine, R. David: Outcome in neonates with convulsions in an intensive care unit. *Ann. Neurol.* 14, (1983), 642-647.
- 16 O.A. Bessey, D.J.D. Adam, A.E. Hansen: Intake of vitamin B6 and infantile convulsions: a first approximation of requirements of pyridoxine in infants. *Pediatrics* 20, (1957), 33-43.

- 17 H.N. Bhagavan, D.B. Coursin, C.N. Stewart: Regional distribution of pyridoxal-5'-phosphate in developing and mature brains and its depletion in pyridoxine deficiency. *Neurochem. Res.*, 2, (1977), 681-687.
- 18 H.N. Bhagavan, M. Coleman, D.B. Coursin: Distribution of pyridoxal-5-phosphate in human blood between the cells and the plasma: effect of oral administration of pyridoxine on the ratio in Down's and hyperactive patients. *Biochemical Medicine* 14, (1975), 201-208.
- 19 H.N. Bhagavan, M. Coleman, D.B. Coursin: The effect of pyridoxine hydrochlorid on blood serotonin and pyridoxal phosphate contents in hyperactive children. *Pediatrics*, 55, (1975), 437-441.
- 20 H.N. Bhagavan, J.M. Koogler, D.B. Coursin: Enzymatic microassay of pyridoxal-5'-phosphate using L-tyrosine apodecarboxylase and L-(1-¹⁴C)-tyrosine. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 46, (1976), 160-164.
- 21 H.N. Bhagavan, J.M. Koogler, D.B. Coursin: Effect of postweanling pyridoxine deficiency on growth and concentration of the coenzyme pyridoxal-5'-phosphate in heart, kidneys, lungs, and adrenals in rats. *Pediat. Res.*, 10, (1976), 730-732.
- 22 W.F. Bosron, R.L. Veitch, L. Lumeng, T.-K. Li: Subcellular Localization of pyridoxal-5'-phosphate-binding proteins in rat liver. *J. Biol. Chem.*, 253, (1978), 1488-1492.
- 23 A. Botteri, A. Hamfelt, L. Söderhjelm: Pyridoxal phosphate, tryptophan, and tyrosine in blood and cerebrospinal fluid in elderly patients. *Upsala J. Med. Sci.*, 89, (1984), 279-284.
- 24 B.D. Bower: Pyridoxine, tryptophan and epilepsy. *Develop. Med. Child. Neurol.*, 7, (1965), 73-83.
- 25 G.E. Boxer, M.E. Pruss, R.S. Goodhart: Pyridoxal-5'-phosphoric acid in whole blood and isolated leukocytes of man and animals. *J. Nutr.*, 63, (1957), 623-636.
- 26 A. Brenner, R.A. Wapnir: A pyridoxine-dependent behavioral disorder unmasked by isoniazid. *Am. J. Dis. Child.*, 132, (1978), 773-776.
- 27 M. Brin: Vitamin B6: chemistry, absorption, metabolism, catabolism and toxicity. In: Human vitamin B6 requirements. Proceedings of a workshop. National Academy of Sciences. Washington, D.C., 1978 1-20.
- 28 V.M. Camp, J. Chipponi, B.A. Faraj: Radioenzymatic assay for direct measurement of plasma pyridoxal-5'-phosphate. *Clin. Chem.*, 29, (1983), 642-644.
- 29 P. Careddu, J. Appolonio, M. Giovannini: Troubles du métabolisme du tryptophane dans le mécanisme pathogénétique des convulsions hyperpyrétiques. *Pédiatrie*, 17, (1962), 359-366.
- 30 B. Chabner, D. Livingston: A simple enzyme assay for pyridoxal-phosphate. *Anal. Biochem.*, 34, (1970), 413-423.
- 31 T.N. Chase, J.R. Walters: Pharmacologic approaches to the manipulation of GABA-mediated synaptic function in man. In: GABA in nervous system function von E. Roberts, T.N. Chase, D.B. Tower (Hrsg.) New York 1976, 497-514.
- 32 H. Chick, M.M. El Sadr, A.N. Worden: Occurrence of fits of an epileptiform nature in rats maintained for a long period on a diet deprived of vitamin B6. *Biochem. J.*, 34, (1940), 595.

- 33 H.N. Christensen: Nature and roles of receptor sites for amino acid transport. In: Role of vitamin B6 in neurobiology von M. S. Ebadi, E. Costa (Hrsg.). New York 1972, 39-62.
- 34 S.-H. Chung, R.A. Cox: Determination of pyridoxal phosphate levels in the brains of audiogenic and normal mice. *Neurochem. Res.* 8, (1983), 1245-1259.
- 35 S.-H. Chung, M. Johnson: Involvement of transition-metal ions and pyridoxal phosphate in the genesis of epilepsy: a hypothesis. *South African J. Sci.*, 79, (1983), 448-453.
- 36 T.A. Clarke, B.S. Saunders: Pyridoxine-dependent seizures requiring high doses of pyridoxine for control. *Am. J. Dis. Child.*, 133, (1979), 963-965.
- 37 M. Coleman, G. Steinberg, J. Tippet, H.N. Bhagavan, D.B. Coursin, M. Gross, C. Lewis, L. DeVau: A preliminary study of the effect of pyridoxine administration in a subgroup of hyperkinetic children: A double-blind crossover comparison with methylphenidate. *Biol. Psychiatry*, 14, (1979), 741-751.
- 38 C. E. Colombini, E.E. Mc Coy: Vitamin B6 metabolism. The utilization of (¹⁴C)-pyridoxine by the normal mouse. *Biochemistry*, 9,(1970) 533-538.
- 39 E. Costa: Vitamin B6 accentuates in the mouse the convulsant action of isonicotinyl hydrazine. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 28, (1952) 1015-1016.
- 40 D.B. Coursin: Vitamin B6 metabolism in infants and children. In: International symposium on vitamin B6 in honor of Professor Paul György. *Vitamins Hormones*, 22, (1964), 755-786.
- 41 D.B. Coursin: Vitamin B6 deficiency in infants. A follow-up study. *Am. J. Dis. Child.*, 90, (1955), 344-348.
- 42 D.B. Coursin: Seizures in vitamin B6 deficiency. In: Inhibition in central nervous system and γ -aminobutyric acid. von E. Roberts (Hrsg.). Oxford 1960 , 295-301.
- 43 H. Cramer: Die Pyridoxin-abhängigen Säuglingskrämpfe. *Dtsch. med. Wschr.*, 87, (1962), 1577-1578.
- 44 D.K. Dastur, N. Santhadevi, E.V. Quadros, F.C.R. Avari, N.H. Wadia, M.M. Desai, E.P. Bharucha: The B-vitamins in malnutrition with alcoholism. *Br. J. Nutr.*, 36, (1976), 143-159.
- 45 J.P. DaVanzo, L. Kang, R. Ruckert, M. Daugherty. *Biochem. Pharmacol.*, 15, (1965), 124. zitiert in : S.R. Snodgrass, L.L. Iversen: Effects of amino-oxycetic acid on (³H)GABA uptake by rat brain slices. *J. Neurochem.*, 20, (1973), 431-439.
- 46 W.B. Dempsey, H.N. Christensen: The specific binding of pyridoxal-5'-phosphate to bovine plasma albumin. *J. Biol. Chem.*, 237, (1962) 1113-1120.
- 47 J.C. Dewhurst, J.J. Hagan, R.G.M. Morris, R. Griffiths: Hippocampal electrical activity and γ -aminobutyrate metabolism in brain tissue following administration of homocysteine. *J. Neurochem.*, 40,(1983) 752-757.
- 48 M. Ebadi, B. Klangkalja, J.D. Deupree: Inhibition of GABA binding by pyridoxal and pyridoxal phosphate. *Int. J. Biochem.*, 11, (1980) 313-317.
- 49 M. Ebadi: Vitamin B6 and biogenic amines in brain metabolism. In: Human vitamin B6 requirements. Proceedings of a workshop. National Academy of Sciences. Washington, D.C., 1978, 129-161.

- 50 M. Ebadi, M. Itoh, J. Bifano, K. Wendt, A. Earle: The role of Zn^{2+} in pyridoxal phosphate mediated regulation of glutamic acid decarboxylase in brain. *Int. J. Biochem.*, 13, (1981), 1107-1112.
- 51 M.S. Ebadi: Ontogenetic alterations of vitamin B6 metabolism in rat brain - evidence of acceleration of its turnover rate. In: *Advances in biochemical psychopharmacology*, Vol.4. Role of vitamin B6 in neurobiology von M.S. Ebadi, E. Costa (Hrsg.). New York 1972 141- 170.
- 52 M. Ebadi, P. Govitrapong: Pyridoxal phosphate and neurotransmitters in brain. In: *Vitamin B6: Metabolism and role in growth* von G.P. Tryfiates (Hrsg.). Westport 1980, 223-256.
- 53 J. Eiderhamn, A. Hamfelt: Pyridoxal phosphate concentration in blood in newborn infants and their mothers compared with the amount of extra pyridoxol taken during pregnancy and breast feeding. *Acta Paed. Scand.*; 69, (1980), 327-330.
- 54 W. Endres, J. Schaub, H.J. Bremer, E. Grütte: Sekundäre Cystathioninurie. *Z. Kinderheilk.*, 110, (1971), 46-58.
- 55 W. Endres, B. Wuttge: Occurrence of secondary cystathioninuria in children with inherited metabolic disorders, liver diseases, neoplasms, cystic fibrosis and celiac disease. *Eur. J. Pediatr.*, 129, (1978), 29-35.
- 56 S. J. Enna, J.H. Wood, S.H. Snyder: γ -Aminobutyric acid (GABA) in human cerebrospinal fluid: radioreceptor assay. *J. Neurochem.*, 28, (1977), 1121-1124.
- 57 W. Ernsting, T.P. Ferwerda: Vitamin B6 in the treatment of epilepsy. *J. A. M. A.*, 148, (1952), 1540-1541.
- 58 R.A. Fishman: *Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system*. Philadelphia 1980.
- 59 J.H. French, D. O'Brien, B. Grueter: Pyridoxine dependency in the syndrome of infantile myoclonic seizures. *Neurology*, 12, (1962), 304.
- 60 G. Frimpter: Cystathioninuria: Nature of the defect. *Science*, 149, (1965), 1095
- 61 E.F. Gale, H.M.R. Epps: Studies on bacterial amino acid decarboxylases. *Biochem. J.*, 38, (1944), 232-256.
- 62 G.E. Gaull: Homocystinuria and other disorders of sulfur metabolism. In: *Scientific approaches to clinical neurology* von E. Goldensohn, S. Appel (Hrsg.). Philadelphia 1977.
- 63 J.Gentz, A. Hamfelt, S. Johansson, S. Lindstedt, B. Persson, R. Zetterström: Vitamin B6 metabolism in pyridoxine dependency with seizures. *Acta Paed. Scand.*, 56, (1967), 17-26.
- 64 R. Griffiths, D.C. Williams, C. O'Neill, J.C. Dewhurst, C.E. Ekuwem, C.D. Sinclair: Synergistic inhibition of (3H)muscimol binding to calf-brain synaptic membranes in the presence of L-homocysteine and pyridoxal-5'-phosphate. *Eur. J. Biochem.*, 137, (1983), 467-478.
- 65 J.C. Gunsalus, W.D. Bellamy: The function of pyridoxine and pyridoxine derivatives in the decarboxylation of tyrosine. *J. Biol. Chem.*, 155, (1944), 557.
- 66 J.C. Gunsalus, W.D. Bellamy, W.W. Umbreit: A phosphorylated derivative of pyridoxal as the coenzyme of tyrosine decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, 155, (1944), 685.
- 67 B. Haber, K. Kuriyama, E. Roberts: L-glutamic acid decarboxylase: A new type in glial cells and human brain gliomas. *Science*, 168, (1970), 598.

- 68 B. Hagberg, A. Hamfelt, O. Hansen: Tryptophan load tests and pyridoxal-5'-phosphate levels in epileptic children. *Acta Paed. Scand.*, 55, (1966), 363-384.
- 69 C. Hallert, S. Allenmark, U. Larsson-Cohn, G. Sedvall: High level of pyridoxal-5'-phosphate in the cerebrospinal fluid of adult celiac patients. *Am. J. Clin. Nutr.*, 36, (1982), 851-854.
- 70 A. Hamfelt: Pyridoxal phosphate concentration and aminotransferase activity in human blood cells. *Clin.Chim. Acta*, 16, (1967), 19-28.
- 71 A. Hamfelt: Age variation of vitamin B6 metabolism in man. *Clin. Chim. Acta*, 10, (1964), 48-54.
- 72 A. Hamfelt: A method of determining pyridoxal phosphate in blood by decarboxylation of L-tyrosine-¹⁴C (U). *Clin. Chim. Acta*, 7, (1962), 746-748.
- 73 H.M. Hammad, A. Al-Sayegh, S. Swanson, M. Ebadi: Dissociation between epileptic seizures induced by convulsant drugs and alteration in the concentrations of pyridoxal phosphate in rat brain regions. *Gen. Pharmacol.*, 14, (1983), 481-489.
- 74 H.A. Harper, G. Löffler, P.E. Petrides, L. Weiss: *Physiologische Chemie* Berlin 1975.
- 75 B.E. Haskell, E.E. Snell: An improved apotryptophanase assay for pyridoxal phosphate. *Anal. Biochem.*, 45, (1972), 567-576.
- 76 W.W. Hawkins, J. Barsky: An experiment on human vitamin B6 deprivation. *Science*, 108, (1948), 284-286.
- 77 T. Hayashi, R. Suhara: Substances which produce epileptic seizures when applied on the motor cortex of dogs, and substances which inhibit the seizures directly. 20th Int. Physiol. Congr., Brussels 1956; Abstracts of Reviews, Abstracts of Communications, 410.
- 78 A. Heeley, R.J.P. Pugh, B.E. Clayton, J. Shepherd, J. Wilson: Pyridoxal metabolism in vitamin B6 responsive convulsions of early infancy. *Arch. Dis. Childh.*, 53, (1978), 794-802.
- 79 P. Holtz, D. Palm: Pharmacological aspects of vitamin B6. *Pharmac. Rev.*, 16, (1964), 113-178.
- 80 R.W. Horton, B.S. Meldrum: Seizures induced by allylglycine, 3-mercaptopropionic acid and 4-deoxypyridoxine in mice and photosensitive baboons, and different modes of inhibition of cerebral glutamic acid decarboxylase. *Brit. J. Pharmac.*, 49, (1973), 52-63.
- 81 R.W. Horton, A.G. Chapman, B.S. Meldrum: The convulsant action of hydrazides and regional changes in cerebral γ -aminobutyric acid and pyridoxal phosphate concentrations. *J. Neurochem.*, 33, (1979), 745-749.
- 82 A. Hottinger, H. Berger; W. Krauthammer: Klinische Beobachtungen zum Problem des Vitamin B6-Metabolismus. *Schweiz. Med. Wschr.*, 94, (1964), 221-228.
- 83 A. D. Hunt, J. Stokes, W.W. McCrory, H.H. Stroud: Pyridoxine dependency: Report of a case of intractable convulsions in an infant controlled by pyridoxine. *Pediatrics*, 13, (1954), 140-145.
- 84 R.W. Hurd, E.J. Hammond, B.J. Wilder: Homocysteine induced convulsions: enhancement by vitamin B6 and inhibition by hydrazine. *Brain Research*, 209, (1981), 250-254.
- 85 D. Jerance, M. Stanulovic: Assessment of vitamin B6 nutrition in man. In: *Vitamin B6: Metabolism and role in growth* von G.P. Tryfiates (Hrsg.). Westport 1980, 357-370.

- 86 G.A.R. Johnston, V.J. Balcar: Amino-oxyacetic acid: A relatively nonspecific inhibitor of uptake of amino acids by brain and spinal cord. *J. Neurochem.*, 22, (1974), 609-610.
- 87 K.F. Killam, J.A. Bain: Convulsant hydrazides I: In vitro and in vivo inhibition of vitamin B6 enzymes by convulsant hydrazides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 119, (1957), 255-262.
- 88 J.C. Kouyoumdjian, M. Ebadi: Anticonvulsant activity of muscimol and γ -aminobutyric acid against pyridoxal phosphate-induced seizures. *J. Neurochem.*, 36, (1981), 251-257.
- 89 K.S. Krishnamoorthy: Pyridoxine-dependency seizure: Report of a rare presentation. *Ann. Neurol.*, 13, (1983), 103-104.
- 90 J. Leinert, J. Simon, D. Hötzel: Methoden und deren Wertung zur Bestimmung des Vitamin-B6-Versorgungszustandes beim Menschen. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 53, (1983), 156-165.
- 91 S. Lepkovsky: Crystalline Factor I. *Science*, 87, (1938), 169-170.
- 92 T.-K. Li, L. Lumeng: PlasmaPLP as indicator of nutrition status: Relationship to tissue vitamin B6-content and hepatic metabolism. In: *Methods in vitamin B6 nutrition. Analysis and status assessment* von J.E. Leklem, R.D. Reynolds (Hrsg.). New York 1981, 289-296.
- 93 Y.H. Loo: Vitamin B6 effects on the developing brain. In: *Vitamin B6: Metabolism and role in growth* von G.P. Tryfiates (Hrsg.). Westport 1980, 187-204.
- 94 I.T. Lott, T. Coulombe, R.V. DiPaolo, E.P. Richardson, H.L. Levy: Vitamin B6-dependent seizures: Pathology and chemical findings in brain. *Neurology*, 28, (1978), 47-54.
- 95 L. Lumeng, M.P. Ryan, T.-K. Li: Validation of the diagnostic value of plasma pyridoxal phosphate measurements in vitamin B6 nutrition of the rat. *J. Nutr.*, 108, (1978), 545-553.
- 96 L. Lumeng, T.-K. Li: Vitamin B6 metabolism in chronic alcohol abuse. *J. Clin. Invest.*, 53, (1974), 693-704.
- 97 L. Lumeng, R.E. Brashear, T.-K. Li: Pyridoxal-5'-phosphate in plasma: source, protein binding, and cellular transport. *J. Lab. Clin. Med.*, 84, (1974), 334-343.
- 98 L. Lumeng, A. Lui, T.-K. Li: Microassay of pyridoxal phosphate using tyrosine apodecarboxylase. In: *Methods in vitamin B6 nutrition. Analysis and status assessment* von J.E. Leklem, R.D. Reynolds (Hrsg.). New York 1981, 57-68.
- 99 L. Lumeng, T.-K. Li: Mammalian vitamin B6 metabolism: regulatory role of protein binding and the hydrolysis of pyridoxal-5'-phosphate in storage and transport. In: *Vitamin B6: Metabolism and role in growth* von G.P. Tryfiates (Hrsg.). Westport 1980, 27-52.
- 100 M. Maitre, L. Ossola, P. Mandel: GABA-transaminase of mammalian brain. In: *GABA - Biochemistry and CNS functions* von P. Mandel, F.V. De Feudis (Hrsg.). New York 1978, 3-20.
- 101 A.E. Martell: Reaction pathways and mechanisms of pyridoxal catalysis. *Advances in Enzymology*, 53, (1982), 163-199.
- 102 D. L. Martin: Carrier-mediated transport and removal of GABA from synaptic regions. In: *GABA in nervous system function* von E. Roberts, T.N. Chase, D.B. Tower (Hrsg.). New York 1976, 347-386.

- 103 H. Maruyama, D.B. Coursin: Enzymic assay of pyridoxal phosphate using tyrosine apodecarboxylase and tyrosine 1-¹⁴C. *Anal. Biochem.*, 26, (1968), 420.
- 104 F. Masugi, Y. Sumi, S. Shimizu, S. Fukui: Transfer of pyridoxal-5'-phosphate from albumin-pyridoxal-5'-phosphate complex to aspartate aminotransferase. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 19, (1973), 229-236.
- 105 D.B. McCormick, E.E. Snell: Pyridoxal Phosphokinase II: Effects of inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 236, (1961), 2085-2088.
- 106 J. McKiernan, D.H. Mellor, S. Court: A controlled trial of pyridoxine supplementation in children with febrile convulsions. *Clin. Pediatrics*, 20, (1981), 208-211.
- 107 H. Mehansho, L.M. Henderson: Transport and accumulation of pyridoxine and pyridoxal by erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 255, (1980), 11901-11907.
- 108 B.S. Meldrum: Epilepsy and γ -aminobutyric acid-mediated inhibition. *Int. Rev. Neurobiol.*, 17, (1975), 1-36.
- 109 B. Meldrum: Convulsant drugs, anticonvulsants and GABA-mediated inhibition. In: *GABA - Neurotransmitters* von P. Krogsgaard-Larsen, J. Scheel-Krüger, H. Kofod (Hrsg.). Copenhagen 1979, 390-405.
- 110 M.J. Neal, M.S. Starr: Effects of inhibitors of γ -aminobutyrate aminotransferase on the accumulation of ³H- γ -aminobutyric acid by the retina. *Br. J. Pharmacol.*, 47, (1973), 543-555.
- 111 R.W. Olsen, M.K. Ticku, D. Greenlee, P. VanNess: GABA receptor and ionophore binding sites: interaction with various drugs. In: *GABA - Neurotransmitters* von P. Krogsgaard-Larsen, J. Scheel-Krüger, H. Kofod (Hrsg.). Copenhagen 1979, 165-178.
- 112 G. Osuide: Pharmacological properties of amino- oxyacetic acid in chicken. *Br. J. Pharmac.*, 44 (1972), 31.
- 113 L. Pauling: On the orthomolecular environment of the mind: orthomolecular theory. *Am.J. Psychiatry*, 131, (1974), 1251-1257.
- 114 L. Pauling: Sensory neuropathy from pyridoxine abuse. *N. Engl. J. Med.*, 310, (1984), 197.
- 115 M. Pérez de la Mora, A. Feria-Velasco, R. Tapia: Pyridoxal phosphate and glutamate decarboxylase in subcellular particles of mouse brain and their relationship to convulsions. *J. Neurochem.*, 20, (1973), 1575-1587.
- 116 E.A. Peterson: Cellulosic ion exchangers. In: *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology* von T.S. Work, E. Work (Hrsg.). Amsterdam 1970.
- 117 E.A. Peterson, H.A. Sober: Preparation of crystalline phosphorylated derivatives of vitamin B6. *J. Am. Chem. Soc.*, 76, (1954), 169-175.
- 118 Pharmacia Fine Chemicals: DEAE-Sepharose CL-6B, CM-Sepharose CL-6B for ion exchange chromatography. 1976.
- 119 L. Reinken: Eine Mikromethode zur Bestimmung von Pyridoxal-5-phosphat im Serum mittels Decarboxylierung von L-Tyrosin-1-¹⁴C. *Internat. Z. Vit.- Ern.- Forschung*, 42, (1972), 476-481.
- 120 L. Reinken, B. Mangold: Pyridoxal phosphate values in premature infants. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 43, (1973), 472-478.

- 121 E. Roberts, S. Frankel: γ -aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.*, 187, (1950), 55-63.
- 122 E. Roberts: Introduction. In: GABA in nervous system function von E. Roberts, T.N. Chase, D.B. Tower (Hrsg.). New York 1976, 1-6.
- 123 J.E. Roussow, D. Labadarios, J.B. McConnell, M. Davis, R. Williams: Plasma pyridoxal phosphate levels in fulminant hepatic failure and the effects of parental supplementation. *Scand. J. Gastroent.*, 12, (1977), 123-127.
- 124 L. Sachs: *Angewandte Statistik*. 6. Auflage, Berlin 1984.
- 125 C. Sawaya, R. Horton, B. Meldrum: Transmitter synthesis and convulsant drugs: effects of pyridoxal phosphate antagonists and allylglycine. *Biochem. Pharmacol.*, 27, (1978), 475-481.
- 126 H. Schaumburg, J. Kaplan, S. Rasmus, N. Vick: Pyridoxine Megavitaminosis produces sensory neuropathy (?Neuronopathy) in humans. *Ann. Neurol.*, 12, (1982), 107-108.
- 127 P.J. Schechter, Y. Tranter, J. Grove: Attempts to correlate alterations in brain GABA metabolism by GABA-T inhibitors with their anticonvulsant effects. In: GABA - Biochemistry and CNS functions von P. Mandel, F.V. DeFeudis (Hrsg.). New York 1978, 43-58.
- 128 K. Schlesinger, L.L. Uphouse: Pyridoxine dependency and central nervous system excitability. In: Role of vitamin B6 in neurobiology von M.S. Ebad, E. Costa (Hrsg.). New York 1972, 105-139.
- 129 D. Schmidt, W. Löscher: GABA concentrations in cerebrospinal fluid and plasma of patients with epileptic seizures. In: Neurotransmitters, seizures, and epilepsy von P.L. Morselli et al. (Hrsg.). New York 1981, 315-324.
- 130 E. Schmidt: Zum Krankheitsbild der Vitamin B6-(Pyridoxin)-Abhängigkeit beim Neugeborenen. *Z. Kinderheilk.*, 89, (1964), 211-221.
- 131 J. Schrijver, A.J. Speek, W.H.P. Schreurs: Semi-automated fluorometric determination of pyridoxal-5'-phosphate (Vitamin B6) in whole blood by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 51, (1981), 216-222.
- 132 C.R. Scriver, D.T. Whelan: Glutamic acid decarboxylase (GAD) in mammalian tissue outside the central nervous system, and its possible relevance to hereditary vitamin B6 dependency with seizures. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 166, (1969), 83-96.
- 133 C.R. Scriver: Comment on vitamin B6 deficiency and dependence syndromes. In: Year Book of Pediatrics, 1963-64 Series von S. Gellis (Hrsg.). Chicago 1964.
- 134 C.R. Scriver: Vitamin B6 deficiency and dependency in man. *Am. J. Dis. Child.*, 113, (1967), 109-114.
- 135 C.R. Scriver: Vitamin B6-dependency and infantile convulsions. *Pediatrics*, 26, (1960), 62-74.
- 136 B. Shane: Vitamin B6 and blood. In: Human vitamin B6 requirements Proceedings of a workshop. National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1978, 111-128.
- 137 Y.S. Shin, R. Rasshofer, B. Friedrich, W. Endres: Pyridoxal-5'-phosphate determination by a sensitive micromethod in human blood, urine and tissues; its relation to cystathioninuria in neuroblastoma and biliary atresia. *Clin. Chim. Acta*, 127, (1983), 77-85.
- 138 Y.S. Shin-Buehring, R. Rasshofer, W. Endres: A new enzymatic method for pyridoxal-5'-phosphate determination. *J. Inher. Metab. Dis.*, 4, (1981), 123-124.

- 139 Y.S. Shin-Buehring, M. Osang, R. Ziegler, J. Schaub: A simple assay for galactokinase using DEAE-cellulose column chromatography. *Clin. Chim. Acta*, 74, (1977), 1-5.
- 140 T. D. Shultz, J.E. Leklem: Urinary 4-pyridoxic acid, urinary vitamin B6 and plasma pyridoxal phosphate as measures of vitamin B6 status and dietary intake in adults. In: *Methods in vitamin B6 nutrition. Analysis and status assessment* von J.E. Leklem, R.D. Reynolds (Hrsg.). New York 1981, 297-320.
- 141 G.H. Sloane-Stanley: The use of the tyrosine apodecarboxylase of *Streptococcus faecalis* R for the estimation of codecarboxylase. *Biochem. J.*, 44, (1949), 567-573.
- 142 M.S. Sloger, R.D. Reynolds: Pyridoxal-5'-phosphate in whole blood, plasma and blood cells of postpartum nonlactating and lactating rats and their pups. *J. Nutr.*, 111, (1981), 823-830.
- 143 E.E. Snell: Summary of session I and some notes on the metabolism of vitamin B6. In: *International Symposium on Vitamin B6 in honor of Professor Paul György. Vitamins Hormones*, 22, (1964), 485-501.
- 144 E.E. Snell: Vitamin B6 Analysis: Some historical aspects. In: *Methods in vitamin B6 nutrition. Analysis and status assessment*. von J.E. Leklem, R.D. Reynolds (Hrsg.). New York 1981, 1-20.
- 145 S.R. Snodgrass, L.L. Iversen: Effects of amino- oxyacetic acid on ³H-GABA uptake by rat brain slices. *J. Neurochem.*, 20, (1973), 431-439.
- 146 S.E. Snyderman, L.E. Holt, R.Carretero, K. Jacobs: Pyridoxine deficiency in the human infant. *J. Clin. Nutr.*, 1, (1953), 200-207.
- 147 L.R. Solomon: Considerations in the use of B6 vitamers in hematologic disorders: I. Red cell transport and metabolism of pyridoxal. *Blood*, 59, (1982), 495-501.
- 148 L.R. Solomon, R.S. Hillman: Regulation of vitamin B6 metabolism in human red cells. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32, (1979), 1824-1831.
- 149 C. L. Spannuth, D. Mitchell, W.J. Stone, S. Schenker, C. Wagner: Vitamin B6 nutriture in patients with uremia and with liver disease. In: *Human vitamin B6 requirements. Proceedings of a workshop*. National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1980, 180-192.
- 150 R. Spector, A.V. Lorenzo: Specificity of ascorbic acid transport system of the central nervous system. *Am. J. Physiol.*, 226, (1974), 1468-1473.
- 151 R. Spector: Megavitamin therapy and the central nervous system. In: *Vitamins in human biology and medicine* von M.H. Briggs (Hrsg.). Boca Raton 1981, 137-156.
- 152 R. Spector: Vitamin B6 transport in the central nervous system: in vivo studies. *J. Neurochem.*, 30, (1978), 881-887.
- 153 R. Spector: Vitamin B6 transport in the central nervous system: in vitro studies. *J. Neurochem.*, 30, (1978), 889-897.
- 154 R. Spector, L.L. Greenwald: Transport and metabolism of vitamin B6 in rabbit brain and choroid plexus. *J. Biol. Chem.*, 253, (1978), 2373-2379.
- 155 R. Spector: Vitamin homeostasis in the central nervous system. *N. Engl. J. Med.*, 296, (1977), 1393-1398.
- 156 A. Statz, K. Felgenhauer: Die Entwicklung der Blut-Liquor-Schranke. In: *Aktuelle Neuropädiatrie IV* von G. Jacobi (Hrsg.). Stuttgart 1982, 198-201.

- 157 J. Storm-Mathisen, F. Fonnum, D. Malthe-Sørensen: GABA uptake in nerve terminals. In: GABA in nervous system function von E. Roberts, T.N. Chase, D.B. Tower (Hrsg.). New York 1976, 387-394.
- 158 C.A. Storvick, J.M. Peters: Methods for the determination of vitamin B6 in biological materials. Vitam. Horm., 22, (1964), 833-854.
- 159 P.R. Sundaresan, D.B. Coursin: Microassay of pyridoxal phosphate using L-Tyrosin 1-¹⁴C and Tyrosine apodecarboxylase. Methods Enzymol., 18A, (1970), 509-512.
- 160 M. Tardy, J. Bardakdjian, P. Gonnard: GABA metabolism in cultured glial cells. In: GABA - Biochemistry and CNS functions von P. Mandel, F.V. DeFeudis (Hrsg.). New York 1978, 177-188.
- 161 H.-G. Tiselius: Metabolism of Tritium-labelled Pyridoxine and Pyridoxal-5'-phosphate in the central nervous system. J. Neurochem., 20, (1973), 937-946.
- 162 D.B. Tower: Neurochemical aspects of pyridoxine metabolism and function. Int. J. Clin. Nutr., 4, (1956), 329-345.
- 163 G.P. Tryfiates, H.P. Morris: Vitamin B6 and neoplasia. In: Vitamin B6: Metabolism and role in growth von G.P. Tryfiates (Hrsg.). Westport 1980, 173-186.
- 164 G. Tunnickliff, T.T. Ngo: The mode of action of homocysteine on mouse brain glutamic decarboxylase and γ -aminobutyrate aminotransferase. Canad. J. Biochem., 55, (1977), 1013-1018.
- 165 W.W. Umbreit, W.D. Bellamy, J.C. Gunsalus: The function of pyridoxine derivatives: a comparison of natural and synthetic codecarboxylase. Arch. Biochem., 7, (1945), 185-199.
- 166 M. Wachstein, J.D. Kellner, J.M. Ortiz: Pyridoxal phosphate in plasma and leukocytes in patients with leukemia and other diseases. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 105, (1960), 563-566.
- 167 H. Wada, T. Morisue, Y. Nishimura, Y. Morino, K. Ichihara: Enzymatic studies on pyridoxine metabolism. Proc. Jap. Acad., 35, (1959), 299-304.
- 168 C. Waldinger, R.B. Berg: Signs of pyridoxine dependency manifest at birth in siblings. Pediatrics, 32, (1963), 161-168.
- 169 C. Walsh: Enzymatic reaction mechanisms. San Francisco 1979, 777-827.
- 170 W. Weiss, W. Figueroa, W.H. Shapiro et al.: Prognostic factors in pneumococcal meningitis. Arch. Intern. Med., 120, (1967), 517-524.
- 171 D.T. Whelan, C.R. Scriver, F. Moyhuddin: Glutamic acid decarboxylase and Gamma-aminobutyric acid in mammalian kidney. Nature, 224, (1969), 916-917.
- 172 R.G. Wiegand: J. Am. Chem. Soc., 78, (1956), 5307. Zitiert in: K. Kanig: Die Bedeutung der B-Vitamine für das Nervensystem. Darmstadt 1968, 72-90.
- 173 H. Wolf: Untersuchungen über den Vitamin-B6-Stoffwechsel. Internat. Zschr. Vitaminforsch., 28, (1958), 281-289.
- 174 J.-Y. Wu, E. Roberts: Properties of brain L-Glutamate decarboxylase: inhibition studies. J. Neurochem., 23, (1974), 759-767.

- 175 B. I.-Y. Yang, D.E. Metzger: Pyridoxal-5'-phosphate and analogs as probes of coenzyme-protein interaction. *Meth. Enzymol.*, 62, (1979) 528-551.
- 176 T. Yoshida, K. Tada, T. Arakawa: Vitamin B6-dependency of glutamic acid decarboxylase in the kidney from a patient with vitamin B6 dependent convulsions. *Tohoku J. Exp. Med.*, 104, (1971), 195-198.
- 177 M. Zachmann, P. Tocci, W.L. Nyhan: The occurrence of γ -aminobutyric acid in human tissues other than brain. *J. Biol. Chem.*, 241, (1966) 1355-1358.

LEBENS LAUF

Name : Rudolf Rainer Raßhofer

Geburtsdatum : 26. 1. 1956

Geburtsort : München

Eltern : Rudolf und Maria Antonie Raßhofer, geb. Hartmannsgruber

Schul Ausbildung :

Grundschule : 1962 bis 1966 in München

Gymnasium : 1966 bis 1975 in München, Abitur Juni 1975

Wehrdienst : 1975 / 76

Studium des Bauingenieurwesens an der TU München 1976 / 77

Medizinstudium :

1977 Zulassung an der Ludwig- Maximilians- Universität in München

Physikum : Sommer 1979

Ärztliche Prüfung, 1. Abschnitt : Sommer 1980

Ärztliche Prüfung, 2. Abschnitt : Sommer 1982

Praktisches Jahr an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster,
am Akademischen Lehrkrankenhaus Herford : 1982 / 83

Ärztliche Prüfung, 3. Abschnitt : Oktober 1983

Approbation : November 1983

Abschluss der 1981 begonnenen experimentellen Dissertation am
Stoffwechsellabor der Haunerschen Kinderklinik der Universität
München : 1984 /85.

